

KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie 2

**Kontinuierliche enzymatische Synthese
mit Coenzym Regenerierung**

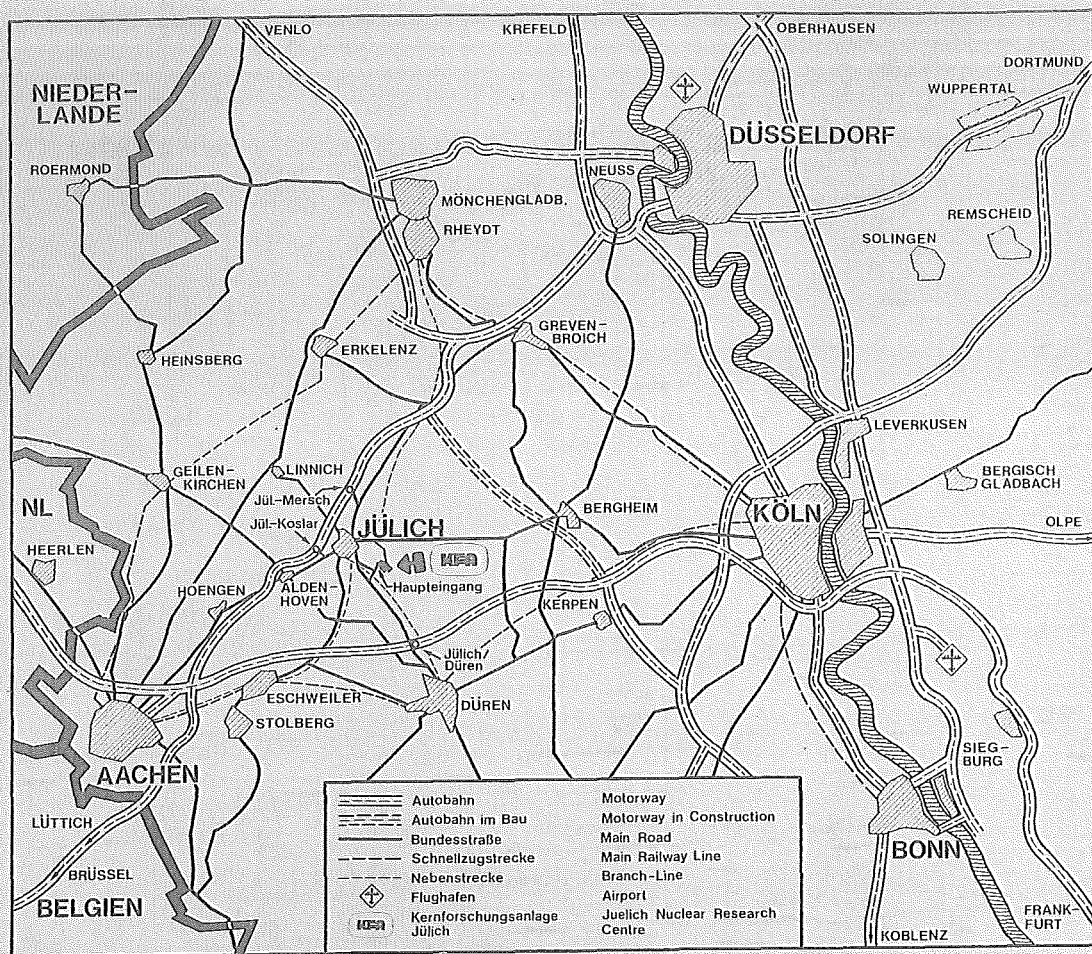
von

R. Wichmann

Jül-Spez-119

Juli 1981

ISSN 0343-7639



Als Manuskript gedruckt

Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 119

Institut für Biotechnologie 2 Jül - Spez - 119

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 024 61/610 · Telex: 833 556 kfa d

Kontinuierliche enzymatische Synthese mit Coenzym Regenerierung

von

R. Wichmann

D 104 (Diss. T.U. Clausthal)

A B S T R A C T

Continuous Enzymatic Synthesis with Coenzyme Regeneration

NAD(H) dependent enzymatic production of L-alanine and L-leucine was performed in an enzyme membrane reactor (EMR). An EMR is a continuous stirred tank reactor which is equipped with an ultra-filtration(UF) membrane at the exit of the reactor to retain enzymes in the reactor.

As the coenzyme was regenerated by enzymatic reduction with formate, only catalytical amounts of coenzyme were needed.

NAD(H) covalently bound to polyethylene glycol (molecular weight= 10000 g/mol) was used to be able to retain the coenzyme in the reactor like the enzymes.

The enzymes showed a similar catalytical activity whether polymer bound NAD(H) or native NAD(H) was used. Kinetic experiments were carried out to obtain data for a calculation of the performance of an EMR for the continuous production of L-alanine or L-leucine respectively.

L-alanine was produced continuously for 4.5 days out of pyruvic acid (2-oxo propanoic acid) with a space-time yield of 70 g L-alanine/(1·d). The enzyme consumption was 3.2 U formate dehydrogenase and 2.5 U alanine dehydrogenase per g L-alanine. The coenzyme was regenerated 656 fold.

L-leucine was produced continuously for 24 days out of α -keto isocaproic acid (2-oxo-4-methyl pentanoic acid) with a space-time yield of 243 g L-leucine/(1·d). The enzyme consumption was 2.1 U formate dehydrogenase and 1.1 U leucine dehydrogenase per g L-leucine. The coenzyme was regenerated 18200 fold.

A b s t r a c t

KONTINUIERLICHE ENZYMATISCHE SYNTHESE

MIT COENZYM REGENERIERUNG

Am Beispiel der NAD(H) abhängigen enzymatischen Produktion von L-Alanin und L-Leucin konnte gezeigt werden, daß sich das Prinzip des Enzym Membran Reaktors (EMR), eines kontinuierlichen Rührkessels, dessen Auslauf mit einer Ultrafiltrations(UF)-Membran zur Retention von Makromolekülen ausgestattet ist, für coenzymabhängige Reaktionssysteme verwenden läßt.

Um das Coenzym in nur katalytischen Mengen verwenden zu können, wurde es durch enzymatische Reduktion mit Formiat regeneriert. Damit das Coenzym ebenso wie die Enzyme bei kontinuierlicher Reaktionsführung durch die UF-Membran des EMR im Reaktor zurückgehalten werden konnte, wurde an Polyethylenglykol (Molekulargewicht 10 000 g/mol) gebundenes NAD(H) eingesetzt (PEG-10 000-NAD(H)). Kinetische Messungen ergaben, daß die Enzyme mit PEG-10 000-NAD(H) eine ähnliche katalytische Aktivität erreichten, wie bei Verwendung von nativem NAD(H).

Mit Kenntnis der Kinetik der Enzyme war es möglich Betriebspunkte für die kontinuierliche Produktion von L-Alanin und L-Leucin zu berechnen.

L-Alanin wurde kontinuierlich aus Brenztraubensäure (2-Oxo-Propan-säure) 4,5 Tage lang mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 70 g L-Alanin/(l·d) hergestellt. Der Enzymverbrauch betrug 3,2 U Formiat Dehydrogenase und 2,5 U Alanin Dehydrogenase pro g L-Alanin. Das Coenzym wurde 656fach regeneriert.

L-Leucin wurde kontinuierlich aus α -Keto Isocaproinsäure (2-Oxo-4-Methyl-Pentansäure) 24 Tage lang mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 243 g L-Leucin/(l·d) hergestellt. Der Enzymverbrauch betrug 2,1 U Formiat Dehydrogenase und 1,1 U Leucin Dehydrogenase pro g L-Leucin. Das Coenzym wurde 18 200fach regeneriert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1977 bis April 1979 im Institut für Chemische Technologie und Brennstofftechnik der TU Clausthal und von Mai 1979 bis Juni 1981 im Institut für Biotechnologie 2 der Kernforschungsanlage Jülich GmbH angefertigt.

Herrn Prof. Dr. C. Wandrey danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit, seine zahlreichen Anregungen und die großzügige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H.H. Oelert gilt mein Dank für die Übernahme des Referates für diese Arbeit.

Den Mitarbeitern der Abteilung für hochmolekulare Naturstoffe der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim, möchte ich für die Unterstützung und Zusammenarbeit meinen Dank aussprechen. Herrn Dipl. Ing. A.F. Bückmann danke ich besonders für die Bereitstellung von polymergebundenen Coenzymen. Frau Priv. Doz. Dr. M.-R. Kula und den Herren Dr. W. Hummel, Ing. (grad.) K.H. Kroner und Ing. (grad.) H. Schütte gilt mein Dank für die Überlassung von Enzymen.

Bei Herrn Dr. W. Leuchtenberger von der Firma Degussa möchte ich mich für die Bereitstellung von Ketosäuren bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau H. Haase vom Institut für Biotechnologie 2 der KFA Jülich für ihre unermüdliche und gewissenhafte Unterstützung bei der Durchführung der enzymkinetischen Messungen.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts für Chemische Technologie und Brennstofftechnik der TU Clausthal und des Instituts für Biotechnologie der KFA Jülich, die mich in mannigfaltigerweise unterstützt haben.

Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie gilt mein Dank für die Bewilligung von Forschungsmitteln für die Durchführung dieser Arbeit.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
Literaturverzeichnis	3
Symbolverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1. Kontinuierliche Reaktionsführung mit Biokatalysatoren	11
1.2. Enzym-Membran-Reaktoren	13
1.3. Problemstellung und Zielsetzung	19
2. Theoretische Grundlagen	24
2.1. Mikrokinetik enzymatischer Reaktionen	24
2.2. Auswertung enzymkinetischer Messungen	32
2.2.1. Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit	32
2.2.2. Ermittlung kinetischer Parameter	35
2.2.3. On-line-Auswertung	40
2.3. Ultrafiltration	43
3. Kinetische Untersuchungen der Reaktionssysteme	49
3.1. Charakterisierung der Enzyme und Coenzyme	49
3.2. Analytik	51
3.3. Kinetische Messungen und Modellentwicklung	55
3.3.1. Kinetik der Formiat Dehydrogenase	60
3.3.2. Kinetik der Alanin Dehydrogenase	66
3.3.3. Kinetik der Leucin Dehydrogenase	74
4. Theoretische reaktionstechnische Berechnungen	85
4.1. Formiat Dehydrogenase - Alanin Dehydrogenase-System	88
4.2. Formiat Dehydrogenase - Leucin Dehydrogenase-System	95
5. Experimentelle reaktionstechnische Untersuchungen	101
5.1. Lagerstabilität der Enzyme und Coenzyme	101
5.2. Stabilität der Einzel-Enzym-Systeme im Membran Reaktor	104

	Seite
5.3. Kontinuierliche enzymatische L-Aminosäure- Produktion mit Coenzymregenerierung	112
5.3.1. Reaktionsführung ohne Nachdosierung von Enzymen bzw. Coenzym	112
5.3.2. Reaktionsführung mit Nachdosierung von Enzymen bzw. Coenzym	124
6. Diskussion	134
7. Zusammenfassung	143
 Anhang	 146
Ablaufplan der rechnergestützten Auswertung enzym- kinetischer Messungen	147
Programmabdruck:	148
Kinetik Auswerteprogramm ALR-ONLINE	
Programmabdruck:	153
Programm zur Optimierung nach Rosenbrock mit einem Unterprogramm zur Lösung von Differentialgleichungen nach Runge und Kutta.	

Literaturverzeichnis

- (1) W.H. Pitcher Jr: Design and Operation of Immobilized Enzyme Reactors, in: Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, Herausgeber: R.A. Messing, Academic Press, New York (1975), 151-199.
- (2) H.H. Weetall: Applications of Immobilized Enzymes, in: Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, Herausgeber: R.A. Messing, Academic Press, New York, (1975), 201-226.
- (3) O. Zaborsky: Immobilized Enzymes, CRC Press, Cleveland (1973).
- (4) I. Chibata: Immobilized Enzymes, Kodansha, Tokyo (1978).
- (5) P. Brodelius: Industrial Applications of Immobilized Biocatalysts, in: Advances in Biochemical Engineering Vol. 10, Immobilized Enzymes I, Herausgeber: T.K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, Springer Verlag, Berlin (1978), 75-129.
- (6) B. Solomon: Starch Hydrolysis by Immobilized Enzymes, Industrial Applications, in: Advances in Biochemical Engineering Vol. 10, Immobilized Enzymes I, Herausgeber: T.K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, Springer Verlag, Berlin (1978), 131-177.
- (7) R.D. Schmid: Stabilized Soluble Enzymes, in: Advances in Biochemical Engineering Vol. 12, Immobilized Enzymes II, Herausgeber: T.K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, Springer Verlag, Berlin (1979), 41-118.
- (8) H. Binder (Herausgeber); Biotechnologie, Umschau Verlag, Frankfurt/Main (1978).
- (9) M.-R. Kula, H. Hustedt, K.H. Kroner, H. Schütte: Enzyme Extraction Processes in Large Scale, in Biochemical Engineering II: Annals of the New York Academy of Sciences, Academic Press New York, (1981) (im Druck).
- (10) R.A. Messing: Introduction and General History of Immobilized Enzymes, in: Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, Herausgeber: R.A. Messing, Academic Press, New York (1975), 1-10
- (11) C. Wandrey, E. Flaschel: Process Development and Economic Aspects in Enzyme Engineering. Acylase L-methionine System, in: Advances in Biochemical Engineering Vol. 12, Immobilized Enzymes II, Herausgeber: T.K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, Springer Verlag, Berlin (1979), 145-218.

- (12) K. Bastin: Analytische und kinetische Untersuchungen zur kontinuierlichen Herstellung von L-Äpfelsäure mit Fumarase, Diplomarbeit am Institut für Chemische Technologie und Brennstofftechnik, TU Clausthal (1979).
- (13) A.-S. Jandel (Institut für Biotechnologie, KFA Jülich): unveröffentlichte Ergebnisse, (1981).
- (14) M.D. Manson, P.O. Larsson, K. Mosbach: Recycling by a Second Enzyme of NAD Covalently Bound to Alcohol Dehydrogenase, FEBS Lett. 98 (1979), 309-313.
- (15) S.S. Wang, C.-K. King: The Use of Coenzymes in Biochemical Reactors, in: Advances in Biochemical Engineering Vol 12, Immobilized Enzymes II, Herausgeber: T.K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, Springer Verlag, Berlin (1979), 119-146.
- (16) C.R. Gardner, C.K. Colton, R.S. Langer, B.K. Hamilton, M.C. Archer, G.M. Whitesides: Enzymatic Regeneration of ATP from AMP and ADP: Part I. Thermodynamics, Kinetics, and Process Development, in: Enzyme Engineering 2, Herausgeber: E.K. Pye, L.B. Wingard Jr. Plenum Press, New York (1974), 209-216.
- (17) D.J. Fink, V.W. Rodwell: Kinetics of a Hollow Fiber Dehydrogenase Reactor, Biotechnol. Bioeng. 17,7 (1975), 1029-50.
- (18) S. Furukawa, N. Katayama, T. Iizuka, I. Urabe, H. Okada: Preparation of Polyethylene Glycol-Bound NAD and its Application in a Model Enzyme Reactor, FEBS Lett. 121,2 (1980), 239-242.
- (19) A.F. Bückmann, M.-R. Kula, R. Wichmann, C. Wandrey: An Efficient Synthesis of High Molecular Weight NAD(H)-Derivatives Suitable for Continuous Operation with Coenzyme Depending Enzyme Systems, J. Appl. Biochem. (1981) (im Druck).
- (20) US. Pat 4108875, Anmeldung 22.08.78.
- (21) H. Schütte, J. Flossdorf, H. Sahm, M.-R. Kula: Purification and Properties of Formaldehyd Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii*; Europ. J. Biochem., 62 (1976), 151-160.
- (22) R. Wichmann: Zur kontinuierlichen Reaktionsführung mit Formiat Dehydrogenase, Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie, TU Hannover (1977).
- (23) M.B. Mathews, B. Vennesland: Enzymic Oxidation of HCOOH, J. biol. Chem., 186 (1950), 667-682.

- (24) H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, Band I und II, Verlag Chemie, Weinheim (1974).
- (25) T.E. Barman: Enzyme Handbook, Springer Verlag, Berlin, Vol. 1 u. 2 (1969), Supplement 1 (1974).
- (26) R. Fahnenstich, J. Heese, H. Tanner: Aminosäuren, in: Ullmans Encyklopädie der Technischen Chemie, Band 7, Herausgeber: E. Bartholomé, E. Biekert, H. Hellmann, Verlag Chemie, Weinheim (1974), 425-443.
- (27) I.H. Segel: Enzyme Kinetics, John Wiley and Sons, New York (1975).
- (28) J.Tze-Fei Wong: Kinetics of Enzyme Mechanisms, Academic Press, London (1975).
- (29) L. Michaelis, M.L. Menten: Die Kinetik der Invertinwirkung, Biochem. Z., 49 (1913), 333-369.
- (30) R. Eisinger, A.J. Cornish-Bowden: Direkt Linear Plot. New Graphical Procedure for Estimating Enzyme Kinetic Parameters, Biochem. J. 139,3 (1974), 715-720.
- (31) F.d.M. Merino: New Method for Determining the Michaelis Constant, Biochem. J. 143,1 (1974), 93-95.
- (32) H. Lineweaver, D. Burk: The Determination of Enzyme Dissociation Constants, J. Am. Chem. Soc., 56 (1934), 658-666.
- (33) G.S. Eadie: The Inhibition of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine, J. biol. Chem., 146 (1942), 85-93.
- (34) C.S. Hanes: Effect of Starch Concentration upon the Velocity of Hydrolysis by the Amylase of Germinated Barley, Biochem. J., 26 (1932), 1406-1421.
- (35) M. Dixon: The Determination of Enzyme Inhibitor Constants, Biochem. J., 55 (1953), 170-171.
- (36) H.H. Rosenbrock: An Automatic Method for Finding the Greatest or Least Value of a Function, Computer J., 3 (1960), 175-184.
- (37) H.H. Rosenbrock, C. Storey: Computational Techniques for Chemical Engineers, Pergamon Press, Oxford (1966), 64-68.
- (38) R. Wichmann, C. Wandrey: On-line Determination of Reaction Rate versus Substrate Concentration for an Enzymatically Catalysed Reaction by Means of a Microcomputer System, in: Enzyme Engineering 5, Herausgeber: H.H. Weetall, G.P. Royer, Plenum Press, New York (1980), 259-261.

- (39) E. Flaschel, C. Wandrey: Membrane Reactors, in: Characterization of Immobilized Biocatalysts, Herausgeber: K. Buchholz, Dechema Monographie Vol. 84, Verlag Chemie, Weinheim (1979), 337-366.
- (40) L. Jandel, B. Schulte, A. F. Bückmann, C. Wandrey: Quantitative Description of the Rejection of Polymeric Catalysts by Ultrafiltration Membranes, J. Membrane Sci., 7,2 (1980), 185-201.
- (41) A. Yoshida, E. Freese: Alanine Dehydrogenase of *Bacillus subtilis*, Biochim. Biophys. Acta, 92 (1964), 33-43.
- (42) A. Yoshida, E. Freese: Enzymic Properties of Alanine Dehydrogenase of *Bacillus subtilis*, Biochim. Biophys. Acta, 96 (1965), 248-262.
- (43) W. Hummel, H. Schütte, M.-R. Kula: Leucine Dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. Optimized Production Conditions and an Efficient Method for its Large-Scale Production, Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 12 (1981), 22-27.
- (44) T. Oshima, H. Misono, K. Soda: Properties of Crystalline Leucine Dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*, J. Biol. Chem., 253 (1978), 5719-5725.
- (45) B.D. Sanwal, M.W. Zink: L-Leucine Dehydrogenase of *Bacillus cereus*, Arch. Biochem. Biophys., 94 (1961), 430-435.
- (46) E. Flaschel: Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen, Dissertation am Institut für Technische Chemie, TU Hannover (1976).
- (47) O.H. Lowry, J.V. Passonneau, M.K. Rock: The Stability of Pyridine Nucleotides, J. Biol. Chem., 236, 10 (1961), 756-2759
- (48) A. Ralston, H.S. Wilfs: Mathematical Methods for Digital Computers, John Wiley and Sons, New York (1962).
- (49) J. Flossdorf (GBF, Braunschweig-Stöckheim), persönliche Mitteilung, (1979).
- (50) U. Oden, R. Wichmann (Institut für Chemische Technologie und Brennstofftechnik, TU Clausthal): unveröffentlichte Ergebnisse (1979).
- (51) L. Jandel (Institut für Biotechnologie, KFA-Jülich): unveröffentlichte Ergebnisse (1980).
- (52) G.M. Whitesides (Department of Chemistry, MIT, Cambridge, Mass. U.S.A.), persönliche Mitteilung, (1980).
- (53) W. Leuchtenberger (Fa. Degussa, Hanau, Werk Wolfgang), persönliche Mitteilung, (1981).

Symbolverzeichnis

Formelzeichen

a,b,c,d	unterschied- lich	Polynomkonstanten
A,B,C,Q	mmol/l	Konzentration
AV	U/(ml·d)	Aktivitätsverlust
COV	<u>mg NAD (H)</u> l·d	Coenzymverlust
CV	<u>mg NAD (H)</u> kg Produkt	Coenzymverbrauch
DES	%	Desaktivierung
E	mg/ml	Enzymkonzentration
E _a	J/mol	Aktivierungsenergie
EA,EAB,EB,ES	mmol/l	Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes
EF	-	Effektivitätsfaktor
EP,EPQ,EQ	mmol/l	Konzentration des Enzym-Produkt-Komplexes
EV	<u>U Enzym</u> kg Produkt	Enzymverbrauch
F _v	ml/h	Volumenstrom
I	mmol/l	Inhibitorkonzentration
k	unterschied- lich	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
k _{des}	1/d	Desaktivierungskonstante
K	unterschied- lich	kinetische Konstante
K _{GL}	unterschied- lich	Gleichgewichtskonstante
K _m	mmol/l	Michaelis-Menten-Konstante
M	g/mol	Molekulargewicht
p	U/mg	präexponentieller Faktor nach Arrhenius
P	mmol/l	Produktkonzentration

R	U/ml = mmol/(l·min)	Reaktionsgeschwindigkeit (Volumenbezogen)
R	U/mg = mmol/(g·min)	Reaktionsgeschwindigkeit (bezogen auf die Enzymkonzentration)
R	-	Retention
R _G	J/(mol·K)	ideale Gaskonstante
S	mmol/l	Substratkonzentration
SV	<u>kg Substrat</u> kg Produkt	Substratverbrauch
t	min	Zeit
T	°C	Temperatur
U	-	Umsatz
V _{max}	U/mg	maximale Reaktionsgeschwindigkeit oder spezifische Enzymaktivität
V _R	ml	Reaktorvolumen
α, β	-	Korrekturfaktor
ε	mol/cm ²	molarer Extinktionskoeffizient
η _{RZ}	g/(l·d)	Raum-Zeit-Ausbeute
τ	h	mittlere Verweilzeit

Indizes

el	Elutions-
F	Filtrat
ges	Gesamt-
gr	Grund-
i	inhibitor
max	maximale
o	Anfangs-
rea, R	Reaktor-
+	Hinreaktions-
-	Rückreaktions-

Abkürzungen

ADP	Adenosin Diphosphat
Ala, ALA	Alanin
ALADH	Alanin Dehydrogenase
ATP	Adenosin Triphosphat
EMR	Enzym Membran Reaktor
F	Formiat
FAD(H)	Flavin Adenin Dinucleotid
FDH	Formiat Dehydrogenase
Kt, KT	α -Keto Isocaproat
L-AOD	L-Aminosäure Oxidase
Leu, LEU	Leucin
LEUDH	Leucin Dehydrogenase
NAD(H)	Nicotinamid Adenin Dinucleotid
NAD ⁺	oxidiertes NAD(H)
NADH	reduziertes NAD(H)
PEG	Polyethylen Glykol
Pyr, PYR	Pyruvat
UF	Ultrafiltration

1. Einleitung

Viele chemische Reaktionen, die aus den Stoffwechselkreisläufen lebender Organismen bekannt sind, werden industriell zur Stoffumwandlung genutzt (1-8). Um den Ablauf dieser Reaktionen in ausreichender Geschwindigkeit überhaupt erst zu ermöglichen, sind von der Natur geeignete Katalysatoren entwickelt worden. Diese biologischen Katalysatoren oder Biokatalysatoren werden als Enzyme bezeichnet.

Die katalytische Wirkung von Enzymen in ihrer natürlichen Umgebung (in ganzen Mikroorganismen) wird z.B. in der Lebensmittelindustrie bei der Herstellung von Käse, Brot oder alkoholischen Getränken seit langem genutzt.

Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß auch sehr komplexe Reaktionsfolgen genutzt werden können und daß der lebende Organismus dafür sorgt, daß eine ausreichende Aktivität der Enzyme aufrecht erhalten wird. Dies ist möglich, indem der Organismus die von ihm benötigten Enzyme selbst produziert und daher ein Verlust an Enzym ausgeglichen werden kann.

Nachteilig an diesem Verfahren ist, daß die Mikroorganismen einen Teil des Ausgangsmaterials (auch Substrat genannt) für ihren Stoffwechsel und ihr Wachstum benötigen, außerdem muß eine gewisse Mindestmenge an Mineralien und Vitaminen vorhanden sein, weiterhin entstehen neben den gewünschten Produkten auch in mehr oder weniger großem Umfang Nebenprodukte und schließlich besteht immer die Gefahr, daß das angestrebte Produkt als Substrat auf anderen Stoffwechselwegen weiter verwendet wird.

Durch die Entwicklung von Trennverfahren (9), die es ermöglichen, Enzyme im großtechnischen Maßstab meist aus Mikroorganismen zu isolieren, wird es möglich, sie als reine Biokatalysatoren in einem immer größeren Bereich wirtschaftlich

einzusetzen wie z.B. in Waschmitteln, bei der Herstellung von Süßstoffen und Pharmazeutika, in der medizinischen Analytik usw. (1-8).

Der Vorteil des Einsatzes von isolierten Enzymen ist ihre hohe Substratspezifität und Produktselektivität, es können z.B. aus optisch nicht aktiven Substraten optisch aktive Produkte hergestellt werden. Ein Nachteil des Einsatzes von isolierten Enzymen ist ihre meist geringere Stabilität im Vergleich zur Nutzung von Enzymen in ganzen Mikroorganismen.

1.1. Kontinuierliche Reaktionsführung mit Biokatalysatoren

Um die katalytische Aktivität von Enzymen optimal zu nutzen, ist es wichtig, Möglichkeiten zu finden, sie vom Reaktionsmedium diskontinuierlich oder kontinuierlich trennen zu können. Die Abtrennung des Enzyms aus dem Reaktionsgemisch ist außerdem dann erforderlich, wenn das Reaktionsprodukt zu Nahrungsmitteln oder Pharmazeutika verarbeitet wird und fremdes Protein in diesen Produkten nicht vorhanden sein darf.

Man kann zwischen drei prinzipiell verschiedenen Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen unterscheiden (3,4,10):

1. Künstliche Vergrößerung des Enzyms durch:

- a) Quervernetzung oder Copolymerisation von nativen Enzym-Molekülen
- b) Kovalente, ionogene oder adsorptive Bindung an ein anorganisches oder organisches inertes Trägermaterial
- c) Geleinschluß des Enzyms

Vorteile:

- Erhöhung der Stabilität des Enzyms durch Schutz seiner Tertiärstruktur.
- Mit einer Fritte abtrennbar wie konventionelle heterogene Katalysatoren, damit einsetzbar im Strömungsrohr.

Nachteile:

- Veränderung der kinetischen Parameter und damit Produktivitätsverlust durch Poren- und/oder Filmdiffusionshemmung.
- Hohe Transportwiderstände beim Geleinschluß des Enzyms.
- Aktivitätsverlust bei der Immobilisierung.
- Fixierungskosten teilweise hoch.
- Hohe Entwicklungskosten, da nicht jedes Fixierungsverfahren universell einsetzbar ist.
- Nicht kovalent gebundene Enzyme werden in geringem Maße ausgewaschen.

2. Zweiphasen-Fixierung durch Ausnutzung von Löslichkeitsunterschieden von Enzym und Substrat bzw. Produkt.

Vorteile:

- Einfache Enzymabtrennung durch Phasentrennung.
- Es können in Wasser schwerlösliche Substrate umgesetzt werden.
- Natives Enzym kann verwendet werden.
- Es entstehen keine Fixierungskosten.

Nachteile:

- Das Verfahren ist auf lipophile Substrate bzw. Produkte beschränkt, wenn eine gute Retention des Enzyms in der enzym-haltigen Phase erreicht werden soll.
- Die Desaktivierung des Enzyms kann durch die Anwesenheit der organischen Lösungsmittel erheblich erhöht werden.

3. Retention des nativen Enzyms durch eine Ultrafiltrations (UF)-Membran mit geeigneter Porengrößenverteilung.

Vorteile:

- Natives Enzym kann verwendet werden.
- Es entstehen keine Fixierungskosten.
- Makromolekulare Substrate können in ausreichender Reaktionsgeschwindigkeit umgesetzt werden.

Nachteile:

- Es entstehen Kosten für die Trenneinheit.
- Die Enzyme desaktivieren frei gelöst schneller als trägerfixiert.
- Ein gewisser Anteil des Enzyms geht durch die Belegung der UF-Membran mit einer Gelschicht verloren.

Mit Hilfe einer Flüssig-Flüssig-Extraktion in wässrigen nicht-mischbaren Phasen werden seit neuerem Enzyme im Maßstab von 10-100 g in einem Ansatz hergestellt (9).

In großtechnischem Maßstab werden trägerfixierte Enzyme unter anderem für die folgenden Verfahren verwendet (1-6):

- Glucoseisomerase zu Umwandlung von Glucose in Fructose
- Invertase zur Umwandlung von Sucrose in Glucose und Fructose
- Pectinase zur Klärung von Fruchtsäften
- Acylase zur Racematen-Trennung von Aminosäuren
- Penicillin-Amidasen bzw. -Acylase zur Produktion von Penicillin
- Amylase zur Stärkehydrolyse

1.2. Enzym Membran Reaktoren

Die Möglichkeit des technischen Einsatzes von nativen Enzymen im UF-Membran Reaktor (auch Enzym Membran Reaktor (EMR) genannt), ist für folgende Verfahren gezeigt worden:

- Produktion von L-Aminosäuren durch stereospezifische Hydrolyse von N-Acetyl-D,L-Aminosäuren (11).
- Produktion von L-Äpfelsäure durch stereospezifische Hydratation von Fumarsäure (12).
- Produktion von L-Asparaginsäure durch stereospezifische Aminierung von Fumarsäure (13).

Industriell werden in freier oder immobilisierter Form bislang nur isolierte Enzyme aus der Klasse der Hydrolasen (z.B. Amylasen, Proteasen, Acylasen), Isomerasen (z.B. Glucose-Isomerase) und Lyasen (z.B. Fumarase, Aspartase) eingesetzt (3-5) (Abb. 1.1.).

Diese Enzyme benötigen im Gegensatz zu den Oxido-Reductasen, den Transferasen und den Ligasen kein Coenzym für die Wirksamkeit ihrer katalytischen Aktivität. Coenzyme, deren Molekulargewicht wesentlich kleiner als das der Enzyme ist, dienen in enzymatischer Reaktion zur Übertragung von Funktionsgruppen. Da Coenzyme meist komplexe, teure organische Verbindungen sind, ist eine wichtige Voraussetzung, um eine wirtschaftliche kontinuierliche Reaktionsführung mit coenzymabhängigen Enzymen zu ermöglichen, daß die Coenzyme ebenso wie die Enzyme im Reaktor zurückgehalten werden können und während des Prozesses ständig regeneriert werden, um ebenfalls wie bei den Enzymen nur katalytische Mengen verwenden zu brauchen.

Abb. 1.1

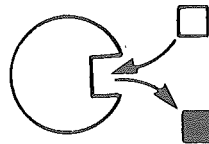


Abb. 1.2

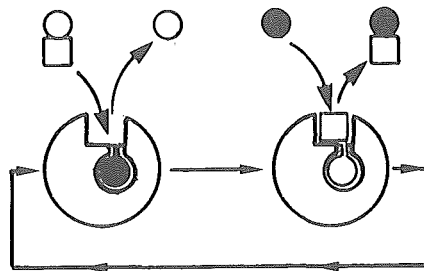


Abb. 1.3

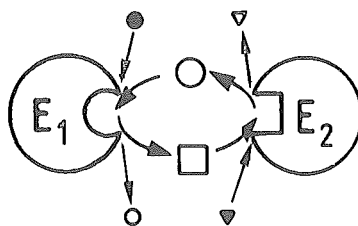


Abb. 1.1., Abb. 1.2., Abb. 1.3.: Reaktionsschema für ein coenzym-unabhängiges Enzym, für ein Enzym mit als prosthetischer Gruppe festgebundenem Coenzym und mit freiem Coenzym.

Enzyme, die ein Coenzym als prosthetische Gruppe gebunden enthalten (Abb. 1.2.) wie Oxidasen die FAD(H) oder Transaminasen die Pyridoxalphosphat enthalten, können eingesetzt werden wie nicht coenzymabhängige Enzyme, d.h. an einem festen Träger immobilisiert oder in freier Form in einem UF-Membran-Reaktor, da das Coenzym mit dem Enzym zusammen im Reaktor zurückgehalten wird. Fest am Enzym gebundene Coenzyme werden entweder durch die Folgereaktion, die am gleichen Enzym abläuft, oder in einem zweiten Reaktionsschritt regeneriert. Ein geringes "Ausbluten" des Coenzym kann jedoch meist nicht vollständig vermieden werden, soweit es nicht kovalent an das Enzym gebunden ist (14) (Abb. 1.4.).

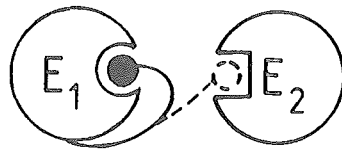


Abb. 1.4.: Enzym mit kovalent gebundenem Coenzym.

Für den Fall, daß das Coenzym als Transport Metabolit zwischen zwei verschiedenen Enzymen dient (Abb. 1.3.), d.h. bei den sogenannten "freien Coenzymen" wie z.B. NAD^+/NADH , ADP/ATP usw., würde eine Trägerfixierung beider Enzyme und des Coenzym zu einer starken Transportlimitierung führen. Sogenannte freie Coenzyme müssen parallel zur gewünschten Reaktion regeneriert werden, um sie effektiv zu nutzen. Hierzu wird im allgemeinen eine zweite enzymatische Reaktion benutzt, seltener kann eine nichtenzymatisch katalysierte chemische Regenerierung durchgeführt werden (15).

Im lebenden Organismus, in dem die Enzyme und Coenzyme in ihrer natürlichen Form enthalten sind, sorgen die selektiven Zellmembranen für die Rückhaltung der Enzyme und Coenzyme in der Zelle. Die Substrate und Produkte können durch aktiven Transport durch die Zellmembran durchgeschleust werden (Abb. 1.5.).

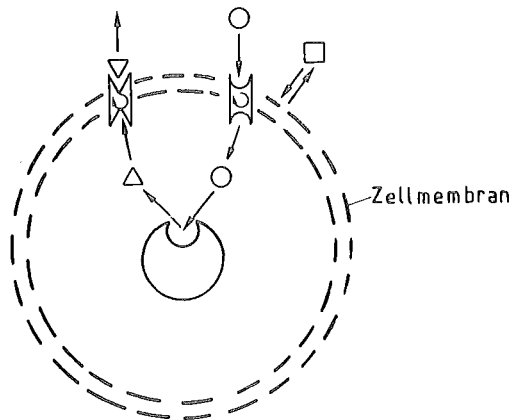


Abb. 1.5.: Enzymatisch katalysierte Reaktion in einer lebenden Zelle mit aktivem Transport des Substrates und Produktes.

Anstatt gemeinsam mit immobilisierten Enzymen immobilisiertes Coenzym zu verwenden, kann eine quasi-kontinuierliche Reaktionsführung realisiert werden, wenn man freies Coenzym in der Substratlösung durch einen Rohrreaktor schickt, der mit trägergebundenen Enzymen zur Reaktion und gleichzeitigen Coenzym Regeneration gefüllt ist (Abb. 1.6.).

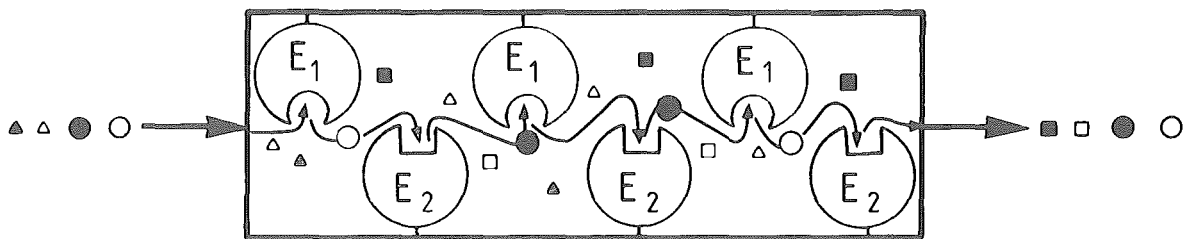


Abb. 1.6.: Wiederholte Nutzung von freiem Coenzym in einem Rohrreaktor mit zwei parallel immobilisierten Enzymen.

Das in der Produktlösung enthaltene Coenzym wird durch Adsorption an Aktiv-Kohle, an ein Ionenaustauscher-Harz oder durch Retention an einer Revers Osmose Membran zurückgehalten und nach einem Desorptionsschritt wieder dem Substratstrom zugeführt (16,17). Da das Coenzym ständig aus dem Produktstrom entfernt werden muß, dürfte diese Art der Reaktionsführung nur bei Enzymsystemen möglich sein, die nur sehr niedrige Coenzym-Konzentrationen benötigen, da die Güte der Methoden zur Wiedergewinnung des Coenzyms aus der Produktlösung von der Coenzym-Konzentration abhängt. Verwendet man native Enzyme und Coenzyme, so ist eine homogene Katalyse ohne Transportlimitierung möglich. Diese Transportlimitierung tritt bei immobilisierten Enzymen und Coenzymen oder bei der Verwendung von ganzen lebenden oder abgetöteten Zellen auf.

Um eine kontinuierliche Reaktionsführung zu ermöglichen, können Revers Osmose Membranen verwendet werden, wenn der Unterschied im Molekulargewicht zwischen den Produkten und dem Coenzym groß genug ist, wenn die Permeabilität für die Produkte gut ist und das Coenzym ebenso wie die Enzyme möglichst quantitativ von der Membran zurückgehalten werden können (Abb. 1.7.).

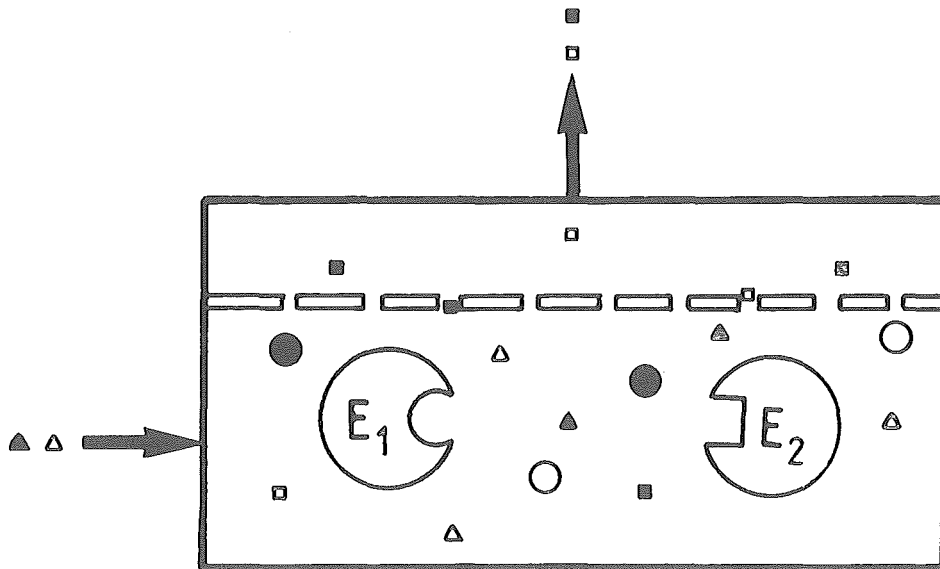


Abb. 1.7.: Enzym Membran Reaktor mit Revers Osmose Membran.

Da die Permeabilität von Revers Osmose Membranen für die Produktlösung jedoch gering ist und ein hoher Differenzdruck nötig ist, was zu hohen Geräte- und Energiekosten führt, wäre es besser, wenn Membranen mit größeren Poren verwendet werden können, nämlich Ultrafiltrations-(UF)-Membranen.

Eine Möglichkeit, freies Coenzym in einem Enzym Membran Reaktor (EMR) mit einer UF-Membran rückhalten zu können, wäre die kovalente Kopplung über einen Spacer an eines der im Reaktor verwendeten Enzyme (Abb. 1.4.) (14). Hierbei sind jedoch aus sterischen Gründen nur geringe Coenzym-Konzentrationen in der Lösung bzw. am Enzym erreichbar.

Eine andere Möglichkeit, Coenzyme mit Hilfe von UF-Membranen aus dem Produktstrom zurückzuhalten, besteht in der kovalenten Kopplung des Coenzym an ein wasserlösliches Polymer mit einem Molekulargewicht in der Größenordnung der Enzyme wie in Abb. 1.8. darstellt (15,18,19).

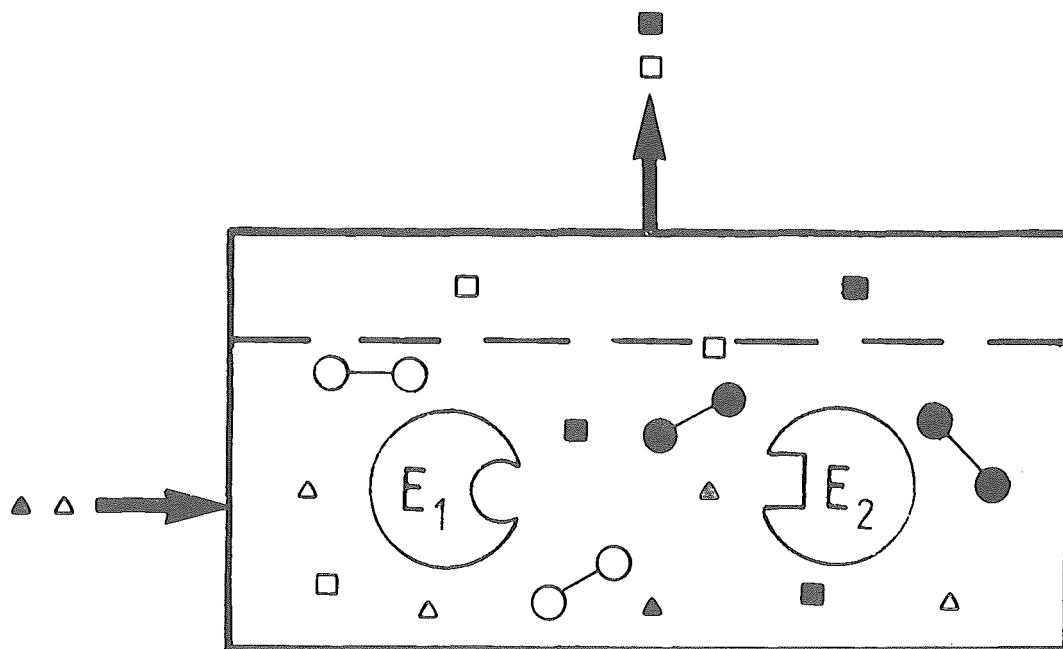


Abb. 1.8.: Enzym Membran Reaktor mit UF-Membran und polymer gebundenem Coenzym.

Die Verwendung von polymergebundenem wasserlöslichem Coenzym mit nativen Enzymen in einem kontinuierlich betriebenen Rührkessel mit einer UF-Membran im Auslauf des Reaktors hat folgende Vorteile:

- Es besteht praktisch keine Transportlimitierung für das Coenzym bei seinem Wechsel zwischen den beiden am Reaktionssystem beteiligten Enzymen.
- Durch eine konvektive Strömung durch die UF-Membran besteht auch für die Substrate und Produkte keine Transportlimitierung.
- Es lassen sich hohe Coenzym-Konzentrationen im Reaktor unterbringen.
- Durch Nachdosierung von Enzymen oder Coenzym läßt sich ein Aktivitätsverlust durch Desaktivierung leicht ausgleichen, so daß bei konstanter Produktivität gearbeitet werden kann.

1.3. Problemstellung und Zielsetzung

Am Beispiel NAD(H) abhängiger Reaktionen soll gezeigt werden, daß sich das Prinzip des Enzym Membran Reaktors (EMR), das sich für coenzymunabhängige Reaktionen bewährt hat, auch auf coenzymabhängige Reaktionssysteme übertragen läßt. Als Modellreaktion wurde die reduktive Aminierung von α -Ketosäuren zu L-Aminosäuren gewählt. Als Substrat können α -Ketosäuren verwendet werden, die preisgünstig durch Umsetzung von Carbonsäurechloriden mit Blausäure und anschließender Verseifung des entsprechenden Carbonsäurenitrils gewonnen werden können (20).

Da in den untersuchten Reaktionssystemen äquimolar zur α -Ketosäure NADH verbraucht wird, ist es nötig, NADH parallel zur gewünschten Reaktion zu regenerieren, um mit katalytischen Mengen auszukommen. Zur Regenerierung von NADH wurde die von Formiat-Dehydrogenase (FDH) katalysierte Oxidation von Formiat zu CO_2 durch NAD^+ gewählt (21,22). Das gesamte Reaktionssystem zur

enzymatischen Synthese von L-Aminosäuren durch reduktive Aminierung aus α -Ketosäuren, bei gleichzeitiger Coenzymregenerierung durch enzymatische Oxidation von Formiat zu CO_2 ist in Abb. 1.9. dargestellt.

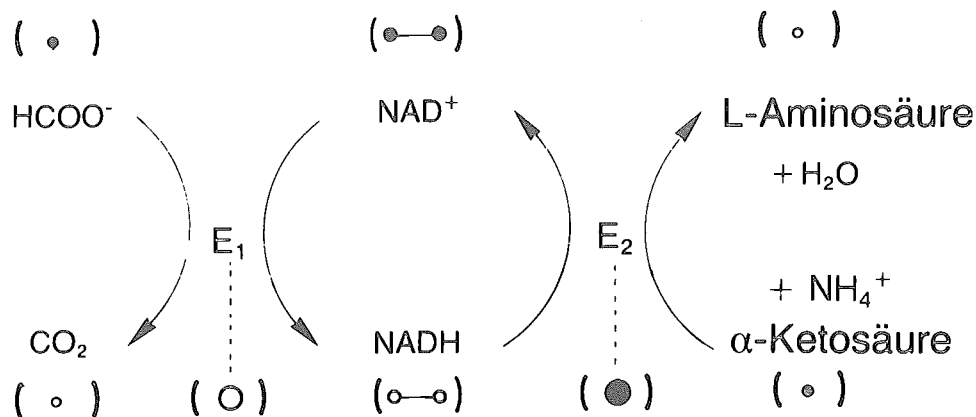


Abb. 1.9.: Enzymatische L-Aminosäure Synthese mit Coenzym-Regenerierung.

Diese Regenerationsreaktion hat mehrere Vorteile: das Substrat ist billig und wasserlöslich bis zu hohen Konzentrationen, das entstehende Produkt CO_2 lässt sich leicht aus der Produktlösung beseitigen, die Reaktion ist praktisch irreversibel (23), eine Rückreaktion ist kaum meßbar (21). Ein Nachteil ist jedoch die geringe Aktivität des Enzyms, so daß hohe Enzym-Protein-Konzentrationen verwendet werden müssen. Andere zur Regeneration von NADH verwendete Enzyme haben meist den Nachteil, daß die Gleichgewichtslage ungünstig ist (15,24,25) und meist durch Beseitigen des Produktes der Regenerationsreaktion vorangetrieben werden muß. Als Beispiel sei Alkohol-Dehydrogenase erwähnt; Ethanol muß entweder in sehr großem Überschuß eingesetzt werden oder entstehendes Acetaldehyd muß z.B. mit Semicarbazid abgetrennt werden. Die Abtrennung der Nebenprodukte ist aufwendiger als die Abtrennung von CO_2 .

Um beim Einsatz von NAD(H) abhängigen Reaktionen in einem EMR das Coenzym ebenso wie die Enzyme mit einer UF-Membran im Reaktor rückhalten zu können, muß das Molekulargewicht des Coenzym durch kovalente Bindung an ein wasserlösliches Polymer erhöht werden.

Bei der kovalenten Bindung von NAD(H) an ein Polymermolekül ist zu beachten, daß der coenzymatisch aktive Teil des Moleküls im Pyridinring liegt. Um eine sterische Hinderung zu vermeiden, kommen als Verknüpfungspunkte mit dem Polymer also nur eine Derivatisierung der Ribose-Hydroxy-Funktion oder des Adenin-Rings in Frage. Wie in verschiedenen Arbeiten (15,18,19) gezeigt wurde, scheint die Amino-Gruppe in der C(6)-Position des Adenin-Rings ein günstiger Punkt zur Bindung an ein Polymermolekül zu sein (vgl. Abb. 3.1.). Wasserlösliche Polymere, die als Trägermolekül für NAD(H) verwendet werden, sind Dextran, Polyethylenimin, Polylysin und Polyethylenglykol (15,18,19). Polyethylenglykol hat als lineares Molekül im Gegensatz zu den anderen Polymeren nur zwei mögliche Bindungsstellen, nämlich die beiden Hydroxy-Gruppen am Ende des Moleküls. In dieser Arbeit wurden N⁶-(2-Amino-ethyl)-NAD(H)-Derivate von Polyethylenglykol (PEG) mit einem Molekulargewicht von 10 000 und 20 000 g/mol verwendet, außerdem wurde ein Dextran-Derivat mit einem Molekulargewicht von 40 000 g/mol zum Vergleich der kinetischen Daten herangezogen ⁺). Das Schema der Kopplung von NAD(H) an PEG ist in Abb. 3.1 dargestellt (19).

⁺) Die Synthese der PEG-NADH und Dextran-NADH Derivate wurde von Dipl.-Ing. A.F. Bückmann, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Abteilung Hochmolekulare Naturstoffe, Braunschweig-Stöckheim, entwickelt.

Als Beispiel für die enzymatisch reduktive Aminierung einer α -Ketosäure zur L-Aminosäure im EMR wurden die folgenden Reaktionen untersucht:

- Produktion von L-Alanin aus Brenztraubensäure (2-Oxo-Propionsäure) mit L-Alanin Dehydrogenase (ALADH) aus *Bacillus subtilis*⁺⁾
- Produktion von L-Leucin aus α -Keto-Isocaproinsäure (2-Oxo-4-Methyl-Pentansäure) mit L-Leucin Dehydrogenase (LEUDH) aus *Bacillus sphaericus*⁺⁾

L-Alanin und L-Leucin werden hauptsächlich im medizinischen Bereich zur klinischen Ernährung (Infusionslösungen) benötigt. Die derzeitige Weltjahresproduktion beträgt 15 bzw. 40 Tonnen. L-Alanin wird hauptsächlich durch Racemattrennung aus synthetischem D,L-Alanin und fermentativ, L-Leucin überwiegend durch Proteinhydrolyse hergestellt (26).

Um die optimalen Betriebsbedingungen für den Einsatz eines EMR zur kontinuierlichen L-Aminosäure-Produktion zu finden, müssen die Massenbilanzen der am Reaktionssystem teilnehmenden Substrate und Produkte aufgestellt und die sich ergebenden Differentialgleichungen gelöst werden. Zur Lösung der Differentialgleichungen ist jeweils ein kinetisches Modell für die die Reaktion katalysierenden Enzyme FDH und ALADH bzw. LEUDH aufzustellen. Hierzu müssen alle den Reaktionsablauf wesentlich beeinflussenden Faktoren mit kinetischen Messungen untersucht werden, so daß die katalytische Wirkung der Enzyme durch eine numerische Anpassung der Daten (mit Programmen zur nichtlinearen Regression) an ein kinetisches Modell formelmäßig beschrieben werden kann.

⁺⁾ Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Coenzymderivate, sowie die Enzyme FDH und LEUDH wurden von der GBF zur Verfügung gestellt. Von der Firma Degussa, Hanau wurde mir das Natriumsalz der α -Keto-Isocaproinsäure zur Verfügung gestellt.

Es ist der Einsatz von polymergebundenem NAD(H) im Vergleich zu nativem NAD(H) durch kinetische Messungen zu untersuchen. Durch einen Einsatz von FDH und ALADH als "Einzel"-Enzyme im EMR in zwei getrennten Experimenten bei Verwendung von nativem NAD(H) soll die Desaktivierung der Enzyme ermittelt werden. Die Desaktivierung und Retention von PEG-10 000-NADH im EMR soll ebenfalls untersucht werden.

Schließlich soll die kontinuierliche L-Alanin- und L-Leucin-Produktion im EMR ohne und mit Nachdosierung von Enzymen und Coenzym unter optimalen Bedingungen, wie sie mit Hilfe der Massenbilanzen berechnet werden sollen, durchgeführt werden, um Desaktivierungsraten für die Enzyme und Coenzyme unter Produktionsbedingungen zu erhalten. Aus den Ergebnissen dieser Versuche soll außerdem die Produktionsleistung an L-Aminosäure und der Enzym- und Coenzymverbrauch für das produzierte Produkt ermittelt werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Mikrokinetik enzymatischer Reaktionen

Reaktionen löslicher Enzyme werden als homogen betrachtet. Die Theorien zum Mechanismus besagen, daß sich als aktive Zwischenstufe ein Komplex aus Substrat und Enzym bildet. Als Beispiel soll das Reaktionsschema für eine Einsubstrat-Reaktion dienen (z.B. das einer Isomerase).



Im stationären Zustand ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit:

$$R = - \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = k_{+2} \cdot \text{ES} - k_{-2} \cdot \text{E} \cdot \text{P} \quad (2.1.)$$

Bezieht man die aktuelle Enzymkonzentration E auf die eingesezte E_0 :

$$\text{E} = E_0 - \text{ES} \quad (2.2.)$$

so ergibt sich:

$$R = k_{+2} \cdot \text{ES} + k_{-2} \cdot \text{P} \cdot \text{ES} - k_{-2} \cdot \text{P} \cdot E_0 \quad (2.3.)$$

Im stationären Fall und unter der Bedingung, daß das Enzym immer mit Substrat gesättigt ist, muß die Konzentration des Komplexes konstant sein. Daher folgt:

$$\frac{d\text{ES}}{dt} = k_{+1} \cdot E_0 \cdot S - k_{+1} \cdot \text{ES} \cdot S + k_{-2} \cdot E_0 \cdot P - k_{-2} \cdot \text{ES} \cdot P - (k_{-1} + k_{+2}) \cdot \text{ES} = 0 \quad (2.4.)$$

und

$$ES = \frac{k_{+1} \cdot S + k_{-2} \cdot P}{k_{+1} \cdot S + (k_{-1} + k_{+2}) + k_{-2} \cdot P} \cdot E_0 \quad (2.5.)$$

Führt man folgende Vereinfachungen ein:

$$K_3 = \frac{k_{-2}}{k_{+1}} \quad (2.6.)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (2.7.)$$

$$P = S_0 \cdot U \quad (2.8.)$$

$$S = S_0 \cdot (1-U) \quad (2.9.)$$

so folgt:

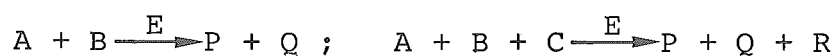
$$R = E_0 \cdot \frac{S_0 \cdot (1-U) + K_3 \cdot S_0 \cdot U}{S_0 \cdot (1-U) + K_m + K_3 \cdot S_0 \cdot U} \cdot (k_{+2} + k_{-2} \cdot S_0 \cdot U) - k_{-2} \cdot S_0 \cdot U \quad (2.10.)$$

Für den Fall, daß $k_{-2} \ll k_{+2}$ ist, erhält man die von Michaelis und Menten gefundene und von Briggs und Haldane hergeleitete Beziehung:

$$R = \frac{k_{+2} \cdot E_0 \cdot S_0 \cdot (1-U)}{K_m + S_0 \cdot (1-U)} = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad (2.11.)$$

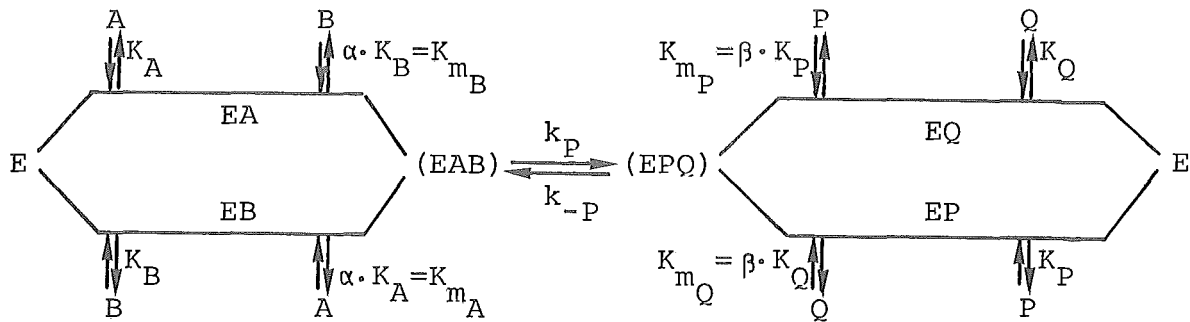
die für viele Enzymreaktionen bei kleiner Substratkonzentration gültig ist.

Bei Zwei- und Drei-Substrat Reaktionen sind die Verhältnisse weitaus komplizierter, als man aus dem Bruttoreaktionsschema erwarten kann (27,28).



Man unterscheidet hauptsächlich zwischen drei grundsätzlich verschiedenen Reaktionsmechanismen:

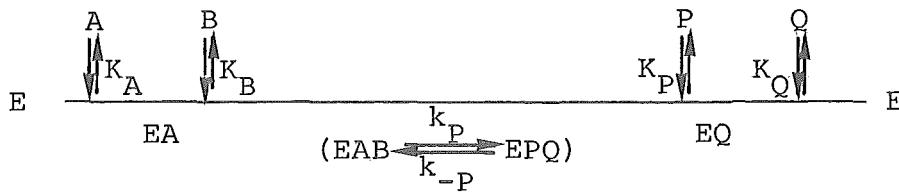
1. Random-Mechanismus:



Beim Random-Mechanismus bilden sich die möglichen binären Enzym-Substrat-Komplexe gleichzeitig nebeneinander und vereinigen sich dann mit dem fehlenden Substrat zu einem ternären Substrat-Komplex. Dieser reagiert ab zu einem ternären Produkt-Komplex (dieser Schritt wird im allgemeinen als der langsamste angenommen). Anschließend dissoziieren die Produkte in beliebiger Reihenfolge. K_A , K_B , K_P und K_Q sind die Dissoziationskonstanten der jeweiligen Enzym-Komplexe, α und β sind Faktoren, die den Unterschied der Dissoziation einer Komponente aus einem ternären zu einem binären Enzym-Komplex berücksichtigen. Der K_m -Wert einer Komponente ist die Dissoziationskonstante dieser Komponente aus dem jeweiligen ternären Enzym-Komplex, also bei einer Sättigungskonzentration für das jeweils andere Substrat oder Produkt. Für den Fall, daß $k_P \gg k_{-P}$ ist, d.h. die Reaktion ist irreversibel, und bei Abwesenheit von Produkten gilt:

$$R_O = V_{\max} \cdot \frac{A \cdot B}{\frac{1}{\alpha} \cdot K_{m_A} \cdot K_{m_B} + K_{m_A} \cdot B + K_{m_B} \cdot A + A \cdot B} \quad (2.12.)$$

2. Ordered-Mechanismus:



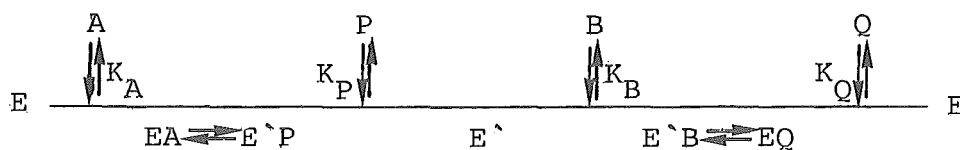
Der "Ordered"-Mechanismus hat, wie der Name schon besagt, einen geordneten Reaktionsablauf: Das erste Substrat reagiert mit dem Enzym zum binären Enzym-Substrat-Komplex. Dann wird das zweite Substrat unter Bildung des ternären Enzym-Substrat-Komplexes gebunden. Dieser reagiert zu einem ternären Enzym-Produkt-Komplex ab. Anschließend dissoziiert zuerst ein Produkt und dann das andere Produkt.

Bei Abwesenheit von Produkten ergibt sich dieselbe kinetische Gleichung wie beim Random-Mechanismus, wenn die Bindung der Substrate geschwindigkeitsbestimmend ist. Ist jedoch die Abreaktion des ternären Enzym-Substrat-Komplexes geschwindigkeitsbestimmend, so vereinfacht sich die Beziehung wie folgt:

$$R = V_{\max} \cdot \frac{A \cdot B}{\frac{1}{\alpha} \cdot K_{m_A} \cdot K_{m_B} + K_{m_B} \cdot A + A \cdot B} \quad (2.13.)$$

α kann beim Ordered-Mechanismus nicht mehr die gleiche Bedeutung haben wie beim Random-Mechanismus, deshalb sollte man α nur als Korrekturfaktor auffassen, da die Zusammenhänge komplexer sind (27).

3. Ping-Pong-Mechanismus:



Beim "Ping-Pong"-Mechanismus vereinigt sich das erste Substrat mit dem Enzym. Darauf dissoziiert das erste Produkt ab. Das Enzym wird durch diesen ersten Schritt modifiziert. Das modifizierte Enzym reagiert dann mit dem zweiten Substrat, und schließlich nach Abreaktion des zweiten Reaktionsschrittes dissoziiert das zweite Produkt ab und das Enzym liegt wieder in seiner ursprünglichen Form vor. Bei Abwesenheit von Produkten ergibt sich folgende kinetische Gleichung:

$$R = V_{\max} \cdot \frac{A \cdot B}{K_{m_B} \cdot A + K_{m_A} \cdot B + A \cdot B} \quad (2.14.)$$

Die kinetischen Gleichungen nach den vorgestellten Mechanismen haben für Dreisubstrat-Reaktionen eine ähnliche Form mit der Erweiterung, daß auch für das dritte Substrat ein K_m -Wert vorhanden ist.

Da eine eindeutige Aussage über den vorliegenden Mechanismus einer komplexen enzymatischen Reaktion selten möglich ist und sehr umfangreiche Messungen voraussetzt, wurden zur Vereinfachung der kinetischen Gleichungen folgende Annahmen gemacht:

1. Die Umwandlung des ternären Enzym-Substrat-Komplexes zu dem ternären Enzym-Produkt-Komplex vollzieht sich langsam.
2. Die beiden Substrate assoziieren und die beiden Produkte dissoziieren schnell.
3. Die Bindung des einen Substrates beeinflußt die des anderen nicht.
4. Jedes Substrat kombiniert nur mit einer Bindungsstelle am Enzym.
5. Die Rückreaktion ist vernachlässigbar unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen.

Ohne Berücksichtigung von möglicherweise vorliegenden Inhibierungen ergibt sich folgendes kinetische Modell:

$$R = V_{\max} \cdot \prod_{i=1}^n \frac{S_i}{K_{mS_i} + S_i} = V_{\max} \cdot \prod_{i=1}^n \frac{S_{i0} \cdot (1-U)}{K_{mS_i} + S_{i0} \cdot (1-U)} \quad (2.15.)$$

mit:

$$V_{\max} = E_0 \cdot \prod_{i=1}^n k_i \quad (2.16.)$$

Die vorgestellte Beziehung ist jedoch bei hohen Substratkonzentrationen und bei höherem Umsatz nur selten gültig, da Substrate, Produkte und auch an der Reaktion nicht beteiligte Fremdstoffe einen inhibierenden oder aktivierenden Einfluß auf die Reaktion haben können.

Man unterscheidet hauptsächlich drei Inhibierungstypen:

1. Nichtkompetitive Inhibierung:

Die inhibierende Komponente beeinflusst die Aktivität des Enzyms, ohne die aktive Stelle zu blockieren und ohne mit dem Substrat in Konkurrenz zu treten. Die Struktur der aktiven Stelle wird jedoch verändert. Es tritt eine Änderung von V_{\max} auf, während K_m nicht verändert wird:

$$V_{\max_i} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{I}{K_I}} \implies R = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{I}{K_I}} \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad (2.17.)$$

2. Kompetitive Inhibierung:

Bei der kompetitiven Inhibierung lagert sich das hemmende Molekül selbst an die aktive Stelle und blockiert diese daher für das Substrat. Dieser Effekt kann durch Erhöhung der Substratkonzentration aufgehoben werden, da nur K_m beeinflusst wird. Eine Produkt-Inhibierung ist häufig von kompetitiver Art, da das Produkt erst aus dem Enzym-Produkt-Komplex abdissoziieren muß, bevor die aktive Stelle wieder für ein neues Substratmolekül zur Verfügung steht.

Die Änderung von K_m wird wie folgt berücksichtigt:

$$K_{m_i} = K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \implies R = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad (2.18.)$$

3. Substratüberschußinhibierung:

Da man in der Biotechnologie meist versuchen wird, mit hohen Substratkonzentrationen zu arbeiten, um die erforderlichen Reaktorvolumina zu begrenzen, ist bei solchen "nicht physiologischen" Substratkonzentrationen eine Substratüberschußinhibierung wahrscheinlich. Es kann sich mehr als ein Substratmolekül an das Enzym anlagern, hierdurch wird die Aktivität des Enzyms verringert. Bei ES_2 -Komplexen gilt:

$$S_i = S \cdot \left(1 + \frac{S}{K_i}\right) \implies R = V_{\max} \cdot \frac{S \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{I1}}\right)}{K_m + S \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{I2}}\right)} \quad (2.19.)$$

Ein weiterer seltener Inhibierungstyp ist die unkompetitive Inhibierung, bei der der Inhibitor sich an das Enzym in der Weise anlagert, daß sowohl Aktivität herabgesetzt als auch die aktive Stelle des Enzyms blockiert wird.

Eine weitere Rolle kann die Allosterie spielen, bei der ein nicht direkt an der Reaktion beteiligter Stoff sich an das Enzym bindet und dadurch eine Konformationsänderung des Enzyms hervorruft. Hierdurch kann die Aktivität entscheidend beeinflußt werden.

Der Einfluß von Aktivatoren wie z.B. Metallionen wird durch empirische Funktionen berücksichtigt. Meist wird jedoch nur die optimale Effekorkonzentration konstant eingestellt.

Der pH-Wert hat einen Einfluß auf enzymatische Reaktionen, der vom betrachteten System abhängt. Er verändert über die pK-Werte von Säuren und Basen deren chemische Eigenschaften.

Die Struktur eines Enzyms und ihr aktives Zentrum werden beeinflusst. Es ergibt sich meist ein pH-Optimum bzw. ein optimaler pH-Bereich.

Der Temperatureinfluss lässt sich befriedigend im Bereich bis 40 - 80 °C je nach der Temperaturstabilität mit der Arrhenius-Beziehung beschreiben, mit der man die Aktivierungsenergie E_a abschätzen kann:

$$R = p \cdot \exp (-E_a / R_G \cdot T) \quad (2.20.)$$

R_G : Gaskonstante

p : Präexponentieller Faktor

T : Temperatur in Kelvin

Bei der Messung der Temperaturabhängigkeit der Aktivität eines Enzyms bekommt man stets ein Aktivitätsmaximum. Da aber mit steigender Temperatur die Stabilität eines Enzyms abnimmt, muß man von einem Aktivitätsmaximum und nicht von einem Temperaturoptimum sprechen, da die Lage des Aktivitätsmaximums sehr stark von der Verweildauer des Enzyms bei der jeweiligen Temperatur abhängt. Die für eine kontinuierliche Reaktionsführung optimale Reaktionstemperatur hängt sehr stark von der Stabilität, der Aktivität und den Kosten des betreffenden Enzyms ab.

Bei der Wahl der Betriebsparameter (z.B. Temperatur und pH-Wert) muß neben der Aktivität und Stabilität der Katalysatoren auch die Substrat- und Produktstabilität beachtet werden.

2.2. Auswertung enzymkinetischer Messungen

2.2.1. Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit

Um den Einfluß unterschiedlichster Faktoren auf die katalytische Aktivität von Enzymen möglichst genau bestimmen zu können, ist die Ermittlung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit am besten geeignet, da die Zusammensetzung eines Reaktionsgemisches zum Zeitpunkt $t=0$, d.h. zum Zeitpunkt des Starts der Reaktion, genau bekannt ist und sich noch keine Reaktionsprodukte gebildet haben, die einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben. Man registriert den Verlauf des Umsatzes der Reaktion als Funktion der Zeit, wobei die Steigung der sich bildenden Kurve der dem jeweiligen Zeitpunkt und Umsatz entsprechenden Reaktionsgeschwindigkeit unter den vorliegenden Bedingungen entspricht.

Im Idealfall wird ein Substrat oder Produkt mit einer die Reaktion nicht beeinflussenden physikalischen Meßmethode gemessen. In der vorliegenden Arbeit wird NADH photometrisch bei 340 nm beobachtet, siehe auch Kapitel 3.2.

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit kann aus den gemessenen Daten mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt werden.

1. Durch graphische Extrapolation der Konzentrations-Zeit-Kurve auf $t=0$ und Ermittlung der Steigung der Kurve bei $t=0$ durch optisches Anlegen der Tangente. Diese Methode ist einfacher und wird daher häufiger angewendet als die 2. Methode.
2. Der gemessene Konzentrations-Zeit-Verlauf kann durch Diskretisieren des Verlaufs in eine Anzahl von C-t-Wertepaare rechnerisch durch ein Polynom beschrieben werden.

$$C = a + b \cdot t + c \cdot t^2 + d \cdot t^3 + \dots \quad (2.21.)$$

da:

$$\frac{dC}{dt} = b + 2c \cdot t + 3c \cdot t^2 + \dots \quad (2.22.)$$

gilt für $t=0$:

$$\frac{dC}{dt} = b \quad (2.23.)$$

Der Koeffizient b stellt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit dar und kann numerisch durch einen Polynomausgleich über die ersten gemessenen C - t -Wertepaare ermittelt werden.

Da jedoch nur im Idealfall die Reaktionsmischung zum Zeitpunkt $t=0$ schon ideal durchmischt ist, vergeht in der Praxis eine gewisse Zeit für diesen Mischvorgang und dafür, die Reaktionsmischung ins Analysengerät zu praktizieren. Der kinetische exakte Zeitpunkt $t=0$ läßt sich also nicht genau bestimmen. Im Gegensatz dazu ist die Anfangskonzentration C_0 der untersuchten Komponente genau bekannt. Eine Extrapolation von $R=f(C)$ auf R_0 bei $C=C_0$ führt zu genaueren Werten für die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit. Extrapoliert man die Kurve $R=f(C)$ auf $R=0$, so erhält man einen genauen Wert für den Gleichgewichtsumsatz bzw. die Gleichgewichtskonzentration des die Reaktion limitierenden Substrates bei Mehrfach-Substrat-Reaktionen, die vom Ausmaß des Überschusses der weiteren Substrate abhängt.

Aus dem Verlauf der Kurve $R=f(C)$ lassen sich weiterhin Rückschlüsse auf den K_m - und V_{max} -Wert der limitierenden Komponente ziehen, bzw. Hinweise auf eine eventuell vorhandene Produktinhibierung finden (vorausgesetzt alle anderen an der Reaktion beteiligten Komponenten sind in einer sättigenden Konzentration eingesetzt).

Aus dem oben beschriebenen Polynom läßt sich für einen Zeitpunkt t ein durch den Polynomausgleich geglätteter C -Wert berechnen und aus der ersten Ableitung nach der Zeit der zugehörige R -Wert bestimmen (siehe Abb. 2.1.):

- Für die Ausgleichsrechnung verwendet man, um den Rechenaufwand zu senken, nur eine Parabel als Polynom.
- Die Anzahl der Wertepaare, die für einen Parabelausgleich verwendet werden, wird begrenzt.
- Indem jeweils ein altes Wertepaar verworfen und ein neues Wertepaar neu hinzugenommen wird, gleitet man an der C-t-Kurve entlang.
- Die Reaktionsgeschwindigkeit und ein "geglätteter" Konzentrationswert wird nur für den jeweils zentralen Punkt eines Parabelausgleichs berechnet.

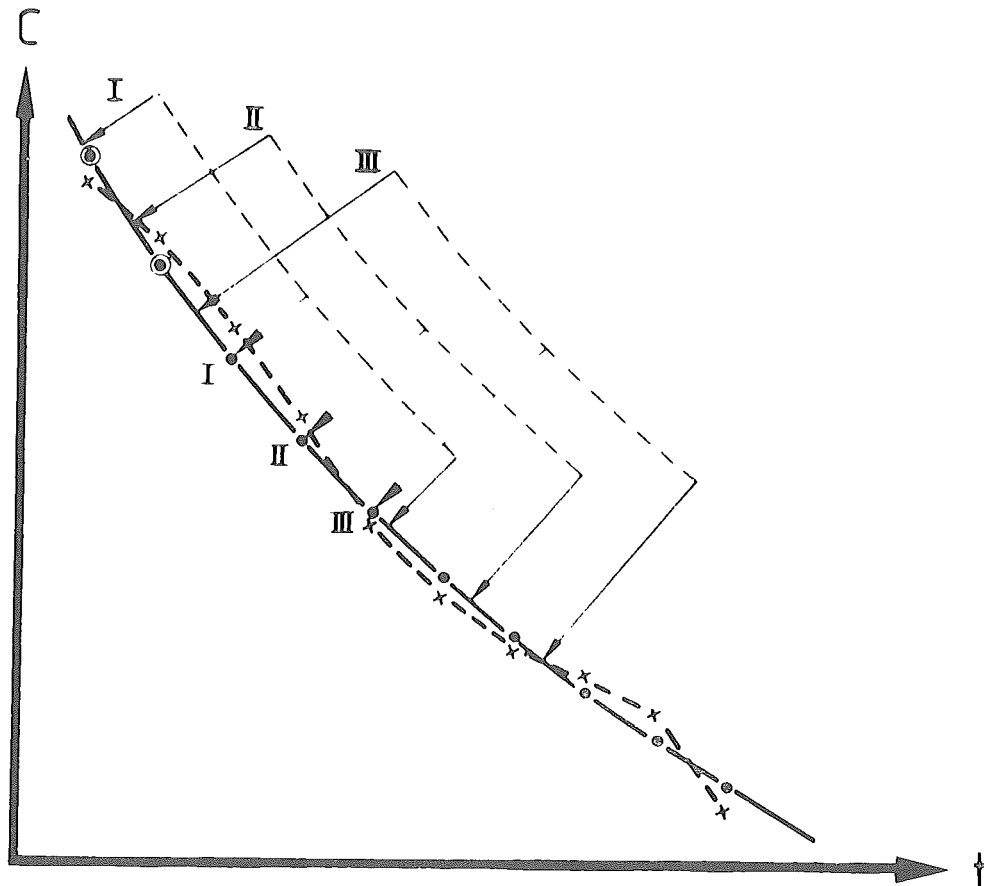


Abb. 2.1.: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit durch einen gleitenden Parabelausgleich.

2.2.2 Ermittlung kinetischer Parameter

Aus einer Meßreihe der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit als Funktion einer Substrat-Konzentration erhält man im Idealfall eine hyperbolische Kurve wie sie von Michaelis und Menten (29) beschrieben wurde (Abb. 2.2.):

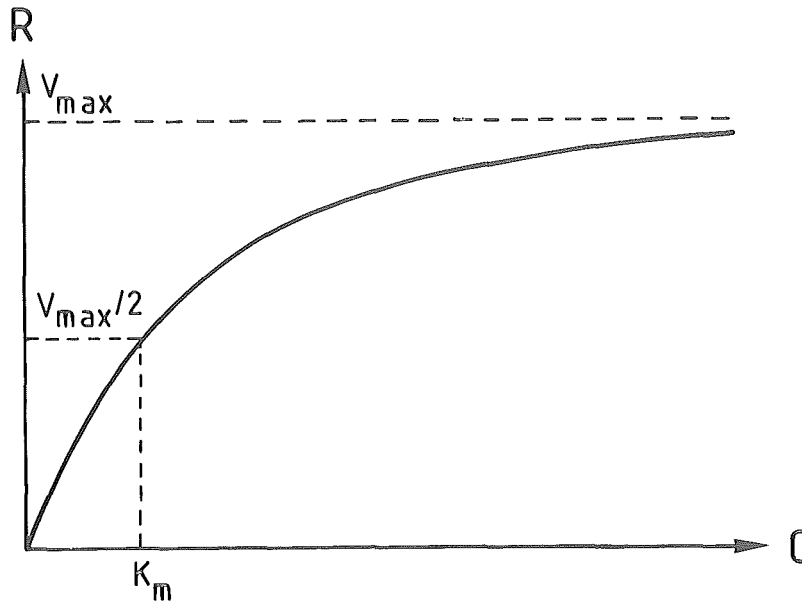


Abb. 2.2.: Bestimmung von V_{\max} und K_m nach Michaelis und Menten.

Die Kurve geht von Reaktion 1. Ordnung bei kleinem C in eine Reaktion 0. Ordnung bei hohem C über. Den Grenzwert von R stellt die kinetische Konstante V_{\max} dar. Eine Reaktionsgeschwindigkeit von $\frac{1}{2} V_{\max}$ wird im Idealfall bei einer Substrat-Konzentration erreicht, die der kinetischen Konstante K_m gleicht. Auf diese Art lassen sich V_{\max} und K_m abschätzen.

Eine weitere Methode dieser Art ist, die jeweils zu einem Datenpunkt zugehörigen Ordinaten- und Abszissenwerte mit einer Geraden zu verbinden. Diese Geraden schneiden sich im Idealfall links neben der Ordinate bei den Koordinaten V_{\max} und $-K_m$, wie in Abb. 2.3. dargestellt ist (30,31).

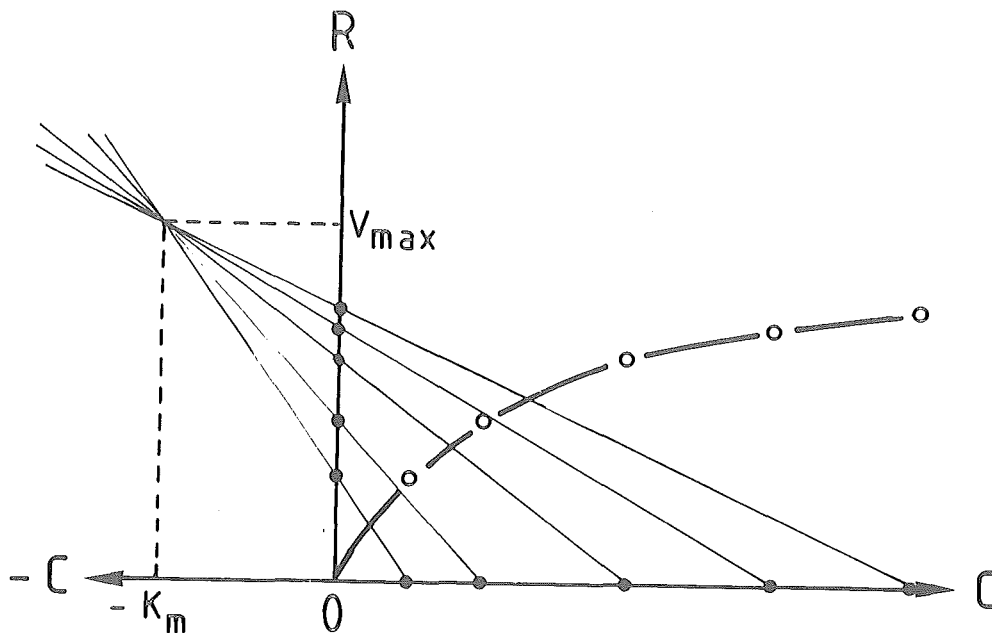


Abb. 2.3.: Bestimmung von V_{\max} und K_m nach Eisenthal, Cornish-Bowden und Merino.

Neben diesen Methoden zum Abschätzen von V_{\max} und K_m gibt es andere Methoden, diese und noch andere kinetische Konstanten genau zu bestimmen, wobei man zwischen graphischen und numerischen Methoden unterscheidet.

Graphische Methoden

Die graphischen Methoden laufen auf eine Linearisierung der kinetischen Gleichung hinaus, d.h. die kinetische Gleichung wird so umgeformt, daß man die kinetischen Konstanten durch eine Ausgleichsgerade bestimmen kann (siehe Abb. 2.4., Abb. 2.5. und Abb. 2.6.):

1. Lineweaver-Burk (32):

$$\frac{1}{R} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.24.)$$

2. Eadie (33):

$$R = V_{\max} - K_m \cdot \frac{R}{C} \quad (2.25.)$$

3. Hanes (34):

$$\frac{C}{R} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \cdot C \quad (2.26.)$$

Abb. 2.4.

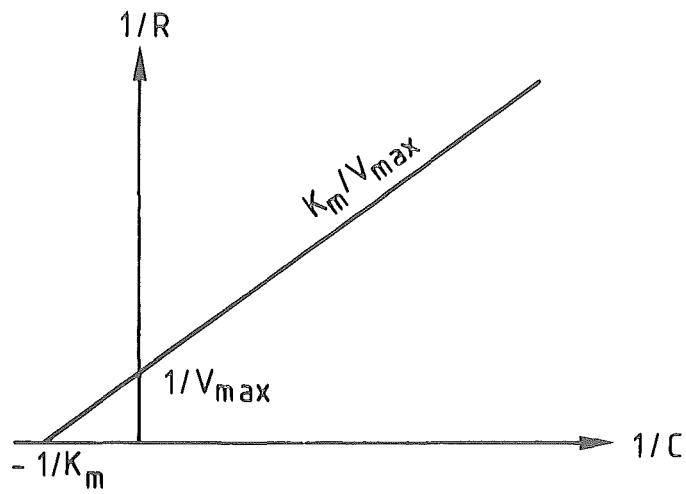


Abb. 2.5.

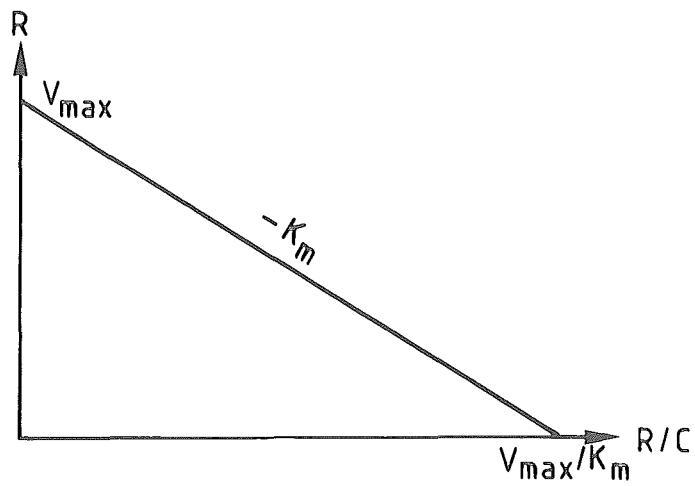


Abb. 2.6.

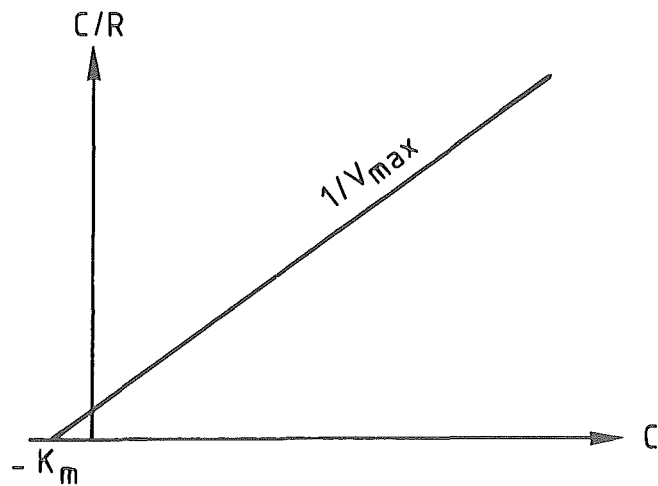


Abb. 2.4., Abb. 2.5., Abb. 2.6.: Linearisierte Auftragung nach Lineweaver und Burk, nach Eadie und nach Hanes zur Bestimmung von V_{\max} und K_m .

Abb. 2.7.

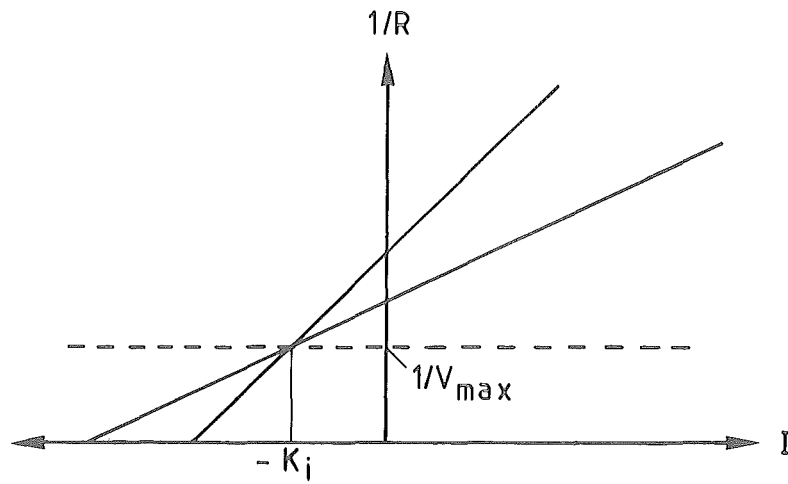


Abb. 2.8.

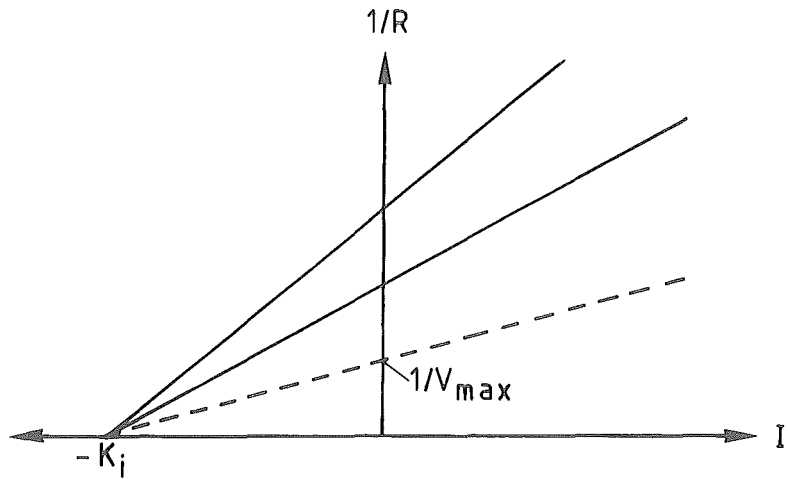


Abb. 2.9.

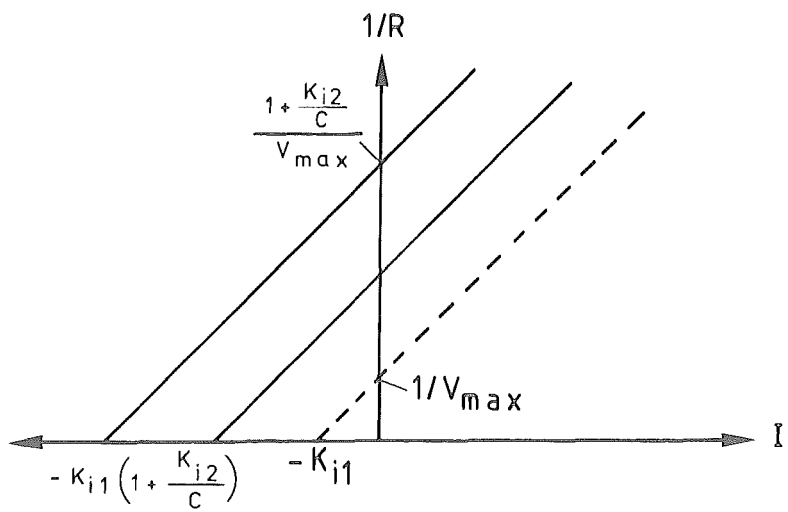


Abb. 2.7., Abb. 2.8., Abb. 2.9.: Linearisierte Auftragung nach Dixon bei kompetitiver, nichtkompetitiver und unkompetitiver Inhibierung zur Ermittlung der Inhibitorkonstanten.

Zur Ermittlung von Inhibitorkonstanten bei kompetitiver, nicht kompetitiver und unkompetitiver Inhibierung wird nach Dixon $\frac{1}{R}$ über I aufgetragen (35) (siehe Abb. 2.7., Abb. 2.8. und Abb. 2.9.). Entsprechend der Art der Inhibierung ergibt sich bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen eine charakteristische Schar von Geraden, aus denen sich V_{\max} , K_m und K_i ermitteln läßt.

Die graphischen Methoden sind zwar einfach zu handhaben, sie haben aber den Nachteil, daß durch die Linearisierung die Wichtung der Meßwerte verändert wird (28).

Numerische Methoden

Durch geeignete Wahl der kinetischen Konstanten V_{\max} und K_m können die gemessenen Daten optimal beschrieben werden. Es gilt z. B. für eine Ein-Substrat-Reaktion, wobei gemessene R-C-Wertepaare eingesetzt werden und jeweils für ein Parameterpaar V_{\max} und K_m die Fehlerquadratsumme berechnet wird:

$$\sum_{\substack{\text{alle Werte} \\ \text{gem.}}} \left(R - \underbrace{\frac{V_{\max} \cdot C}{K_m + C}}_{\text{berechnet}} \right)^2 \stackrel{!}{=} \text{Minimum} \quad (2.27.)$$

Bei den graphischen Methoden wird die gemessene Funktion $R=f(C)$ nicht direkt angepaßt, dies ist jedoch mit Hilfe der nichtlinearen Regression möglich. Hierzu sind verschiedene Verfahren bekannt. Ausgewählt wurde ein Verfahren nach Rosenbrock (36,37), welches sehr schnell konvergiert. Nach diesem Verfahren lassen sich auch komplexe kinetische Modelle optimieren, wobei jedoch relativ gute Schätzwerte für die kinetischen Konstanten angegeben werden müssen, damit die Rechnung konvergiert.

Durch eine statistische Analyse unter der Annahme einer Gauss'schen Fehlerverteilung können die Standardabweichungen der kinetischen Parameter und Korrelationskoeffizienten zwischen

verschiedenen kinetischen Parametern bestimmt werden. Diese Information dient dazu, Modellschwächen zu erkennen und die Anzahl der Modellparameter möglichst zu begrenzen. Der Vergleich zwischen graphischen (linearen) und numerischen (nicht-linearen) Methoden zeigt, daß die nichtlineare Regression die genauesten Parameterschätzwerte liefert (28).

2.2.3. On-line Auswertung

Um die numerische Methode zur Ermittlung von R als Funktion der Substrat-Konzentration C bzw. des Umsatzes mit vertretbarem Zeit- und Kostenaufwand durchführen zu können, wurde ein Mikrocomputer-System aufgebaut, welches diese Aufgabe Online, d.h. parallel neben dem laufenden Experiment, durchführen kann (38).

Dazu wurde auf der Basis des in Maschinensprache programmierbaren, kommerziell erhältlichen KIM-Mikroprozessor Entwicklung Systems von MOS Technology (Norristown, PA, USA) ein Mikrocomputer System aufgebaut (siehe Abb. 2.10.).

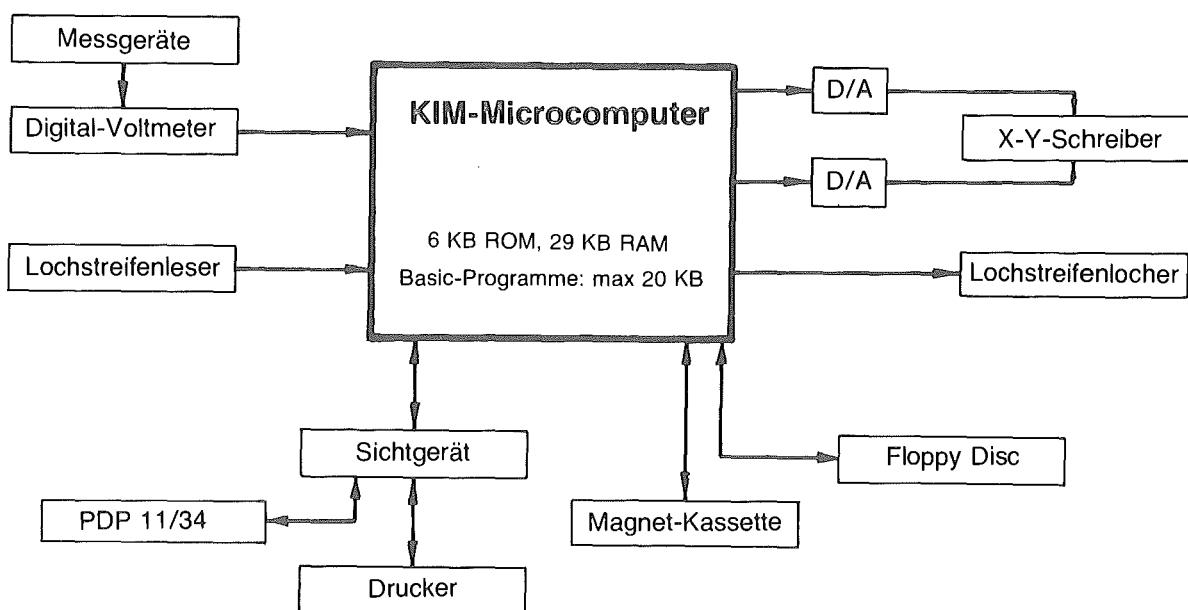


Abb. 2.10.: Mikrocomputer System

Das Grundsystem wurde mit einem Hauptspeicher von 28 K Byte RAM (Lese- und Schreibspeicher) und 4 K Byte ROM (Festwertspeicher) ergänzt. Folgende Peripheriegeräte wurden über entsprechende Interface-Bausteine angeschlossen:

- Magnetbandkassette
- Floppy Disc Gerät (als Massenspeicher für Systemsoftware, Anwender-Programme und Daten)
- Lochstreifen Lese- und Stanzgerät (für die einfache Übertragung von Anwender-Programmen und Daten von und an andere Datenverarbeitungssysteme)
- Sichtgerät
- Drucker

Über einen BCD-Eingang können digitale Meßwerte direkt oder analoge Meßwerte über ein Digitalvoltmeter eingegeben werden. Eine Datenausgabe kann auch über zwei Digital-Analog-Wandler erfolgen, die mit einem X-Y-Schreiber verbunden sind. Über ein Interface im Sichtgerät wurde das Mikrocomputer System an einen größeren Rechner, einen PDP 11/34 Prozeßrechner der Firma Digital Equipment, angeschlossen, um Daten und Programme direkt übertragen zu können.

Um eine einfachere und flexiblere Möglichkeit zu haben, Anwendungsprogramme für den Mikrocomputer zu schreiben, wurden ein Assembler, ein Disassembler und ein Basic Interpreter als Software gekauft. Der Assembler und Disassembler wurden verwendet, um selbst Treibersoftware für den software-mäßigen Anschluß der Peripheriegeräte an den Basic Interpreter zu erstellen.

Das Programm ALR (siehe Anhang) führt die Datenerfassung und die Online-Berechnung des Verlaufs der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Konzentration und die Ausgabe an den X-Y-Schreiber durch. In Abb. 3.3. ist das Ergebnis eines kinetischen Experiments als Zeichnung dargestellt, wie sie vom Programm ALR auf dem X-Y-Schreiber erzeugt wurde.

Die weitere Auswertung erfolgt Off-line, d.h. nach Ende des Experimentes. Es werden aus dem gemessenen Reaktionsgeschwindigkeits-Konzentrations-Verlauf bezüglich der Konzentration äquidistante Wertepaare ausgewählt, die zur Bestimmung der kinetischen Parameter dienen. Diese kinetischen Parameter werden durch nicht lineare Regression ermittelt. Die Schwankungsbreiten der kinetischen Parameter werden bei Annahme einer Normalverteilung der Fehler ebenfalls bestimmt. Im Anhang ist der Ablaufplan der rechnergestützten Auswertung der kinetischen Messungen abgebildet.

Für komplexe enzymatische Modelle mit vielen Modellparametern ist das Mikrocomputer System bei der Parameteroptimierung bezüglich der Rechengeschwindigkeit überfordert, obwohl dies prinzipiell möglich ist und auch durchgeführt wurde. Die entsprechenden Programme wurden daher für den Prozeßrechner PDP 11/34 umgeschrieben.

2.3. Ultrafiltration

Mit Ultrafiltration bezeichnet man im allgemeinen die Filtration hochmolekularer Stoffe mit einem Molekulargewicht von 1 000 bis 1 000 000 g/mol , entsprechend einer mittleren Molekülgröße von 1 bis 25 nm. Die Filtration größerer Moleküle, Mikroorganismen bzw. Partikel, die noch nicht mit Glasfilterfritten oder gewöhnlichem Papierfilter filtrierbar sind, bezeichnet man als Mikrofiltration. Die Teilchengröße liegt zwischen 25 nm und 10 μm . Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 1 000 g/mol lassen sich aus einem Flüssigkeitsstrom ebenfalls zurückhalten, hierbei kann man jedoch nicht mehr von einer Filtration sprechen, sondern von einer Revers Osmose. Da Revers-Osmose-Membranen einen starken ionischen Charakter auf ihrer Oberfläche haben, beruht die Trennwirkung nicht mehr allein auf der Größe der Poren. Es treten deutliche Unterschiede bei der Retention von ionischen und nichtionischen Molekülen auf.

Zur Ultrafiltration werden flüssigkeits- und gasdurchlässige Folien mit außerordentlich feinen Poren, sogenannte Ultrafiltrations-(UF)-Membranen verwendet. Von der Struktur der Membran her kann man unterscheiden zwischen symmetrischen und asymmetrischen Membranen. Symmetrische Membranen haben eine homogene Struktur mit einem ungefähr konstanten Porendurchmesser innerhalb der Membran. Asymmetrische Membranen dagegen bestehen aus einer sehr dünnen Folie (Dicke 0,1 - 1,5 μm), welche die eigentliche UF-Membran darstellt, die zur Erhöhung der mechanischen Stabilität auf eine großporige (Dicke 150 μm) Stützschiicht aufgetragen ist. Als Material zur Herstellung von UF-Membranen verwendet man Celluloseacetat, regenerierte Cellulose, Polysulfon, Polyamin, PTFE und Polyvinylchlorid, wobei die beiden letzteren Materialien ihrer großen Poren wegen hauptsächlich für die Trennung von makromolekularen Stoffen mit mehr als 100 000 g/mol benutzt werden. Für den Einsatz in Enzym-Membran-Reaktoren sind hydrophile Membranen vorzuziehen, da solche Membranen in ihren ionischen Wechselwirkungen mit den Enzymen weitmehr natürlichen Zellwänden ähneln und damit einen

geringeren desaktivierenden Einfluß auf Enzyme haben als hydrophobe Membranen.

Wesentliche Faktoren für die Auswahl eines geeigneten Membran-Materials sind neben der gewünschten Porengröße bzw. Porengrößenverteilung und Permeabilität für das Eluat eine ausreichende pH- und Temperatur-Stabilität, eine gute Stabilität gegenüber mikrobiellem Befall und gegenüber Agentien, die zur Sterilisierung des Reaktors verwendet werden wie Formaldehyd und Ethanol.

UF-Membranen werden hergestellt als Flachmembranen und als Hohlfasern mit unterschiedlichem Innendurchmesser (von weniger als 1 mm bis zu mehreren cm). Je nach der benötigten Membranfläche werden Flachmembranen auch gestapelt oder spiralförmig aufgewickelt eingesetzt, wobei dichte Separatorfolien und Netzfolien verwendet werden, um einen möglichst kompakten Aufbau zu ermöglichen. Hohlfasern werden im allgemeinen gebündelt in einem Rohr eingesetzt, die Enden mit einer Dichtungsmasse vergossen, wobei die inneren Öffnungen an den Enden ausgespart bleiben.

UF-Membranen müssen im Betrieb quer zur Oberfläche angeströmt werden, um die Bildung einer Gelschicht aus abzutrennenden makromolekularen Substanzen bzw. eine Konzentrationspolarisation möglichst gering zu halten. Um turbulente Strömungsbedingungen im Inneren der Hohlfaser anzunähern und um Verstopfungen zu vermeiden, sollte der Innendurchmesser von Hohlfasern nicht zu klein sein. Hohlfasern mit Innendurchmessern von weniger als 500 μm neigen bei hohen Proteinkonzentrationen zur Verstopfung (39). Durch eine Gelschicht erhöht sich einerseits der Druckabfall über die Membran (durch eine scheinbare Verlängerung der Pore der Membran und gleichzeitige Verringerung des Porendurchmessers) andererseits wird die Trennwirkung der Membran verbessert, indem die Gelschicht als zusätzliche Membran fungiert.

Für die Strömung einer Lösung durch eine einzelne Pore einer Membran gilt das Hagen-Poiseuille'sche Gesetz:

$$J = K \cdot \frac{r^2 \cdot C_m \cdot \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot \Delta x} \cdot 0,01 \quad +) \quad (2.28.)$$

J	$\frac{\text{mol}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}}$	Massenstrom
K	-	Konstante der Komponenten (Funktion der Retention)
r	μm	Porenradius
C_m	$\frac{\text{mol}}{\text{l}}$	Konzentration der Komponenten
Δp	bar	Druckabfall über die Membran
η	$\frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}}$	Dynamische Viskosität
Δx	μm	Länge der Poren

Dem Vorteil der Verbesserung der Retention durch eine Sekundärmembran steht der Nachteil entgegen, daß das in der Sekundärmembran gebundene Enzym der homogenen Katalyse entzogen ist und damit weniger effektiv genutzt werden kann. Dieser Effektivitätsverlust ist auf Transportlimitierungen und auf Kanalbildung in der Gelschicht zurückzuführen.

Da bei Ausbildung einer Sekundärmembran vor der UF-Membran in jedem Fall die Sättigungskonzentration des Enzymproteins vorliegt, besteht immer die Gefahr eines erhöhten Polymerverlusts, sofern die Retention durch die Ausbildung der Sekundärmembran nicht entsprechend erhöht wird.

Die Retention beschreibt die Rückhaltefähigkeit der Membran (40):

$$R = \frac{C_R - C_F}{C_R} \quad (2.29.)$$

+) Dimensionsumrechnung

R : Retention

C_R : Konzentration im Reaktor (zurückgehaltene Komponente)

C_F : Konzentration im Filtrat

Ein mit erzwungener Strömung betriebener Membranreaktor stellt im Idealfall einen kontinuierlichen Rührkessel dar. Die Massenbilanz für das abzutrennende Polymer lautet wie folgt:

$$\frac{dC_R}{dt} = - C_F \cdot \frac{F_V}{V_R} = - C_F \cdot \frac{1}{\tau} \quad (2.30.)$$

Durch Verwendung von Gleichung (2.29) folgt:

$$\frac{dC_R}{dt} = - (1 - R) \cdot C_R \cdot \frac{1}{\tau} \quad (2.31.)$$

Nach Integration folgt:

$$\frac{C_R}{C_{R_0}} = e^{-\frac{(1-R)}{\tau} \cdot t} \quad R = 1 + \frac{\tau}{t} \cdot \ln \frac{C_R}{C_{R_0}} \quad (2.32.)$$

Als Ausspülhalbwertszeit ergibt sich:

$$t_{1/2} = - \frac{\tau \cdot \ln 0,5}{(1 - R)} \quad (2.33.)$$

Handelt es sich bei dem Polymer um ein Enzym, so spricht man auch von der Aktivitätshalbwertszeit. Als "Desaktivierung" des Polymers durch Ausspülen aus dem Reaktor ergibt sich für eine gegebene Verweilzeit τ in der Zeit t eine Desaktivierung von:

$$DES = 100 \cdot \left(\frac{C_{R_0} - C_R}{C_{R_0}} \right) = 100 \cdot \left(1 - e^{-\frac{(1-R)}{\tau} \cdot t} \right) \quad (2.34.)$$

Eine Desaktivierungskonstante k_{des} kann als Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung wie folgt definiert werden:

$$k_{\text{des}} = \frac{(1-R)}{\tau} \quad (2.35.)$$

Der Verlust an Polymer durch Ausspülen kann formal als Reaktion erster Ordnung angesehen werden.

In Abb. 2.11. ist für mehrere verschiedene Retentionen der UF-Membran die "Desaktivierung" eines Enzyms im Membranreaktor dargestellt.

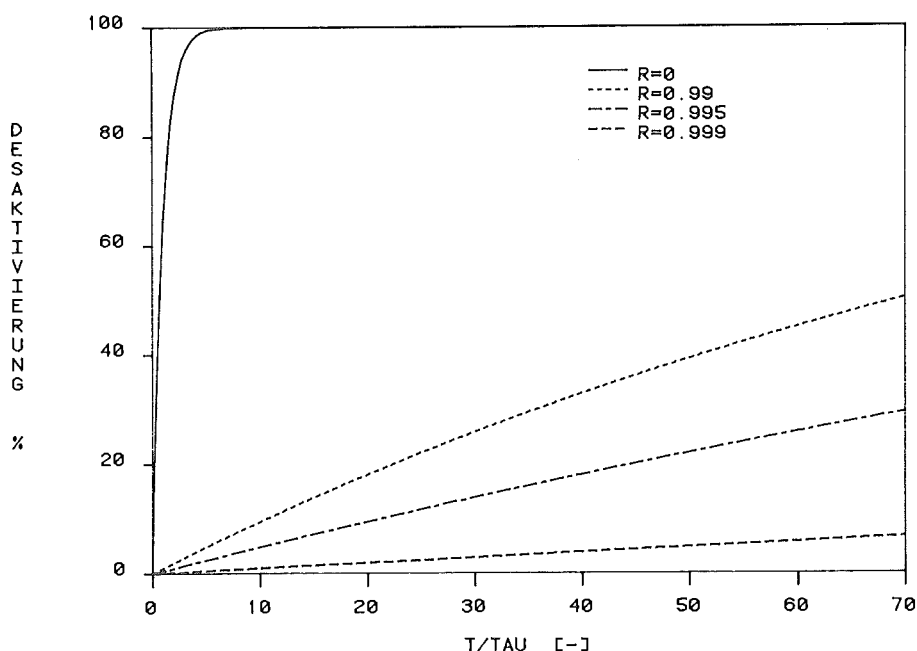


Abb. 2.11.: Desaktivierung als Funktion der Operationszeit bei unterschiedlicher Retention

Wie hoch die Retention in der Praxis sein muß, hängt im wesentlichen von der Operationszeit ab. Sollen niedermolekulare Komponenten aus einer Polymer-haltigen Lösung durch Ausspülen beseitigt werden, so reichen 7 Verweilzeiten aus, um die Konzentration der niedermolekularen Verbindung bei einer Retention $R=0$ auf weniger als 0,1 % der Konzentration des Polymers zu senken, dessen Retention $R=0,99$ beträgt. Während dieser Zeit

gehen weniger als 7 % des Polymers verloren. In 70 Verweilzeiten gehen dagegen über 50 % und in 700 Verweilzeiten über 99,9 % verloren.

Für eine Protein-Aufkonzentrierung ist also eine Retention von 0,99 ausreichend, nicht jedoch für den Einsatz im kontinuierlich betriebenen EMR.

3. Kinetische Untersuchungen der Reaktionssysteme

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen dargestellt, die durchgeführt wurden, um alle den Reaktionsablauf der durch FDH, ALADH und LEUDH katalysierten Reaktionen wesentlich beeinflussenden Faktoren zu erfassen. Als Coenzym wurde neben nativem NAD(H) auch an PEG-10 000 kovalent gebundenes NAD(H) verwendet. Zum Vergleich wurden auch Proben von PEG-20 000-NAD(H) und Dextran-40 000-NAD(H) verwendet. Für FDH, ALADH und LEUDH wurden kinetische Modelle aufgestellt, deren Parameter durch Anpassung an die kinetischen Daten durch nichtlineare Regression erhalten wurden, sowohl bei Verwendung von nativem NAD(H) als auch bei Verwendung von PEG-10 000-NAD(H). Die Konzentrationsangaben für Polymer gebundenes Coenzym beziehen sich im folgenden immer auf das Coenzym und nicht auf den Polymer, der an einem Molekül mehr als ein Coenzym-Molekül gebunden haben kann.

3.1. Charakterisierung der Enzyme und Coenzyme

Formiat Dehydrogenase

- Kürzel: FDH (EC. 1.2.1.2.)
- Quelle: *Candida boidinii*
- Hersteller: GBF
- Verfahren der Herstellung: Schütte et al. (9,21)
- bekannte Stoffdaten (21,23):
 - Gleichgewichtskonstante für die Oxidation von Formiat:
 $K_{GL} = 35\ 000$
 - Rückreaktion 5000-mal langsamer
 - Molekulargewicht: $M = 74\ 000\ \text{g/mol}$
 - pH-Optimum: 7,5 - 8,5
 - $K_{mNAD^+} = 0,09\ \text{mmol/l}$; $K_{mF} = 13\ \text{mmol/l}$ bei pH 7,5 und 30 °C
 - keine Effektoren
 - Inhibitoren: Cu^{2+} , Hg^+ , CN^- , N_3^- , CNO^- und p-Chloromercuribenzoat.

L-Alanin_Dehydrogenase

- Kürzel: ALADH (EC. 1.4.1.1.)
- Quelle: Bacillus subtilis
- Hersteller: Fa. Boehringer
- Verfahren der Herstellung: Yoshida et al. (41,42)
- bekannte Stoffdaten (41,42):
 - Gleichgewichtskonstante für die Aminierung von Pyruvat:
 $K_{GL} = 3,23 \cdot 10^{+13} \text{ l}^2/\text{mol}^2$
 - Molekulargewicht: $M = 228000 \text{ g/mol}$
 - pH-Optimum: 8,8 - 9,0
 - $K_{mNADH} = 0,023 \text{ mmol/l}$; $K_{mPyr} = 0,54 \text{ mmol/l}$
 $K_{mNH_4^+} = 38 \text{ mmol/l}$ bei pH 8, 25 °C, Tris-Puffer
 - keine Effektoren
 - Inhibitoren: Schwermetall-Ionen, HS^- -blockierende Reagentien

L-Leucin_Dehydrogenase

- Kürzel: LEUDH (EC. 1.4.1.9.)
- Quelle: Bacillus sphaericus
- Hersteller: GBF
- Verfahren der Herstellung: Hummel et al. (43)
- bekannte Stoffdaten (44,45):
 - Gleichgewichtskonstante für die Aminierung von α -Keto Isocaproat: $K_{GL} = 9,01 \cdot 10^{+12} \text{ l}^2/\text{mol}^2$
 - Molekulargewicht: $M = 245000 \text{ g/mol}$
 - pH-Optimum: 9,5
 - thermisch sehr stabil (5 min stabil bei 60 °C)
 - $K_{mNADH} = 0,035 \text{ mmol/l}$; $K_{mKt} = 0,31 \text{ mmol/l}$
 $K_{mNH_4^+} = 200 \text{ mmol/l}$ bei pH 9,5 und 25 °C
 - keine Effektoren
 - Inhibitoren: Pyridoxal-Phosphat, D-Aminosäuren deren L-Enantiomer Substrate sind, p-Chloromercuribenzoat, $HgCl_2$, $CuSO_4$, $CoCl_2$, $MgCl_2$ und Na_2S
 - Außer L-Leucin kann auch L-Isoleucin, L-Valin und L-Norvalin mit hoher Enzymaktivität produziert werden.

Polyethylenglykol-10_000-N⁶-(2-Amino-ethyl)-NAD(H)

- Kürzel: PEG-10 000-NAD(H)
- Hersteller: GBF
- Verfahren der Herstellung: Bückmann et al. (19)
- mittleres Molekulargewicht: $M = 11\,200 \text{ g/mol}$
- Der enzymatisch wirksame Gehalt des PEG-10 000-NAD(H) lag je nach Präparation zwischen 85 - 90 % des photometrisch meßbaren Gehalts, die Konzentration an Coenzym lag zwischen 3 und 6 mmol/l.
Das Schema der Herstellung von PEG-10 000-NAD(H) ist in Abb. 3.1. dargestellt.

3.2. Analytik

Zur Messung des Verlaufs der von NAD(H) abhängigen Dehydrogenasen katalysierten Reaktionen eignet sich am besten die Photometrie. Der Dihydropyridin-Teil des NADH-Moleküls zeigt bei 340 nm für natives NADH und bei 338 nm für polymergebundenes NADH, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, eine charakteristische Absorption. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt für natives und für polymergebundenes NADH (19):

$$\epsilon_{340} = 6220 \text{ mol/cm}^2$$

Bei diesen Wellenlängen zeigt das oxidierte Coenzym keine Absorption.

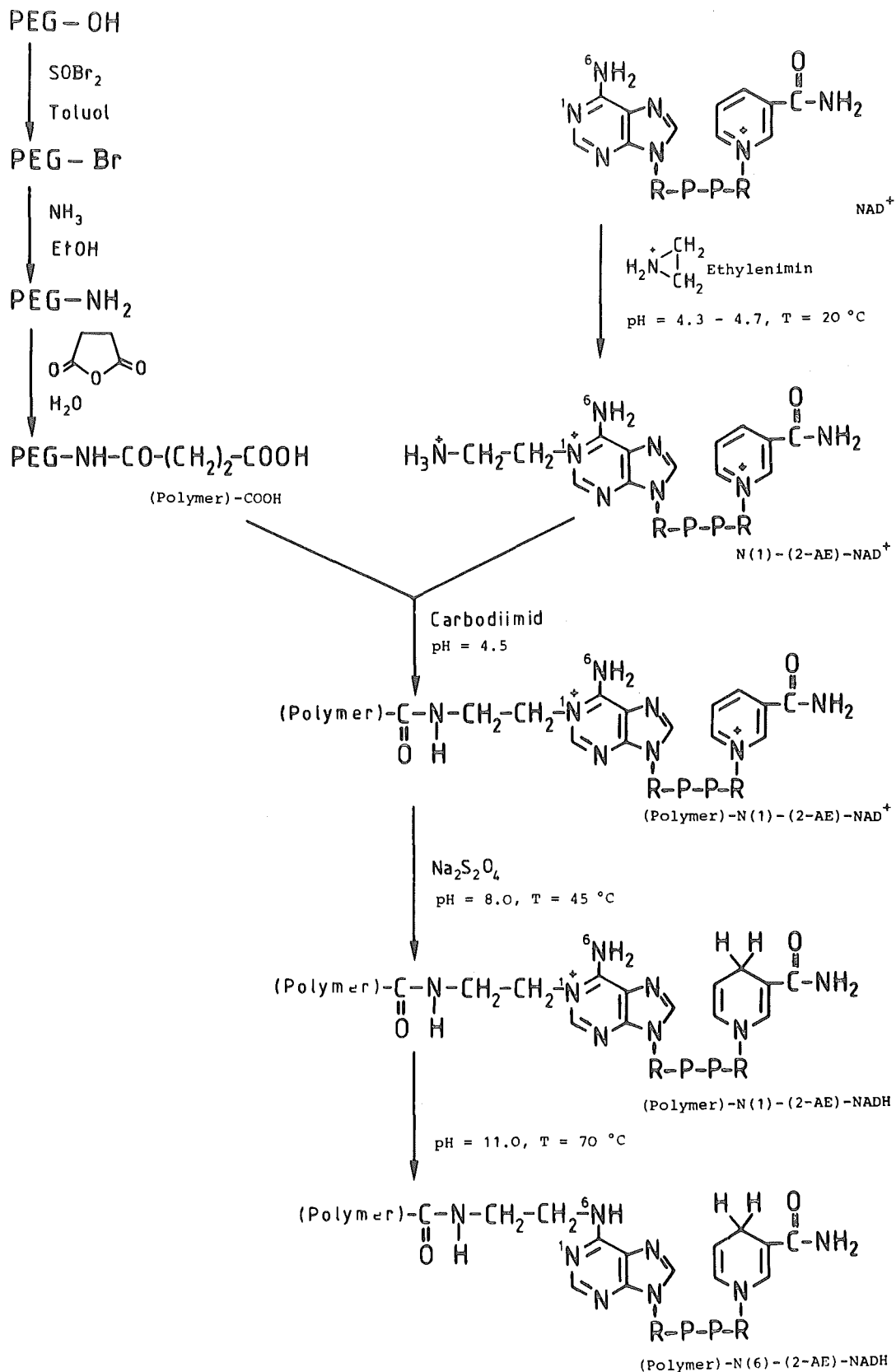


Abb. 3.1.: Synthese von PEG-10 OOO-NAD(H).

(P=Phosphat, PEG=Polyethylenglykol, R=Ribose)

Diese Meßmethode ist sehr präzise und ermöglicht einen Meßbereich bezüglich des direkt meßbaren NADH-Konzentrationsbereichs von 0,01 bis 15 mmol /l bei Verwendung von Küvetten mit Schichtdicken zwischen 10 und 0,2 mm. Es wurde ein Zweistrahl-Photometer der Fa. Shimadzu Typ UV 140 verwendet.

Die voltammetrische Methode zur Bestimmung der NAD(H)-Konzentration eignet sich nicht bei kinetischen Messungen (22).

Die polarimetrische Bestimmung von NAD(H) ist mit genügender Genauigkeit nur bei Konzentrationen über 2 mmol/l möglich. Außerdem entstehen während der Reaktion optisch aktive Aminosäuren und beeinflussen damit den Drehwert.

Die fluorimetrische Bestimmung von NAD(H) ist zwar empfindlicher als die photometrische Methode, aber umständlicher, da die Messung häufig durch eine Eichung kalibriert werden muß.

Bei den Experimenten im Enzym-Membran-Reaktor wurde der Umsatz der Reaktion durch Messung des optischen Drehwertes der Produktlösung polarimetrisch gemessen. Diese Messung wurde in einem Polarimeter der Fa. Perkin-Elmer Modell 241 durchgeführt. Die Produktlösung wurde im kontinuierlichen Strom in einer Durchflußküvette mit 10 cm Schichtdicke vermessen. Eichkurven zur Ermittlung der L-Alanin bzw. L-Leucin Konzentration in der Produktlösung eines EMR-Experiments aus dem optischen Drehwert sind in Kapitel 5.3.1. dargestellt. Die polarimetrische Umsatzbestimmung ist möglich, da das Produkt L-Aminosäure die einzige chirale Verbindung in der Produktlösung ist. Mit Hilfe einer Eichung für den jeweiligen kontinuierlichen Versuch entsprechend der Zusammensetzung der Substratlösung konnte der Umsatz aus dem optischen Drehwert ermittelt werden.

Zur Überprüfung der polarimetrisch ermittelten Umsatzwerte wurden die Produktlösungen der Versuche zur L-Alanin- und L-Leucin-

Produktion mit Hilfe eines Aminosäure Analysers und für L-Leucin durch enzymatische Oxidation, katalysiert durch L-Aminosäure Oxidase, untersucht (46).

Die enzymatische L-Aminosäure Bestimmung wurde wie folgt durchgeführt:

- 2 ml einer Lösung von 20 mg o-Dianisidind hydrochlorid in 0,1 mol/l Tris-Puffer pH 7,5 und an Sauerstoff gesättigt,
- 0,05 ml einer Suspension von L-Aminosäure-Oxidase (L-AOD) in 3,2 mol/l Ammoniumsulfat-Lösung mit einer Aktivität von 5 U/ml ,
- 0,01 ml einer Suspension von Peroxidase (POD) in 3,2 mol/l Ammoniumsulfat-Lösung mit einer Aktivität von 2500 U/ml und
- 0,1 ml einer 100-fach verdünnten Probe der Produkt-Lösung werden vermischt.

Die Bildung eines Farbstoffs wird nun durch Messung der Extinktion des Reaktionsgemisches bei 480 nm in einem Photometer beobachtet. Die Konzentration des Farbstoffs, die nach Abschluß der Reaktion erreicht wird, ist proportional zur L-Aminosäure Konzentration in der Probelösung. Die Analyse basiert auf der desaminierenden Oxidation der L-Aminosäure zur entsprechenden α -Ketosäure, katalysiert durch das Enzym L-Aminosäure Oxidase. Das gleichzeitig entstehende Wasserstoffperoxid wird zu Wasser reduziert in der durch das Enzym Peroxidase katalysierten Oxidation von o-Dianisidin zum entsprechenden Chinimin. Dieses Chinimin ist ein rot-oranger Farbstoff. Das Reaktionsschema der enzymatischen L-Aminosäure Bestimmung ist in Abb. 3.2. dargestellt.

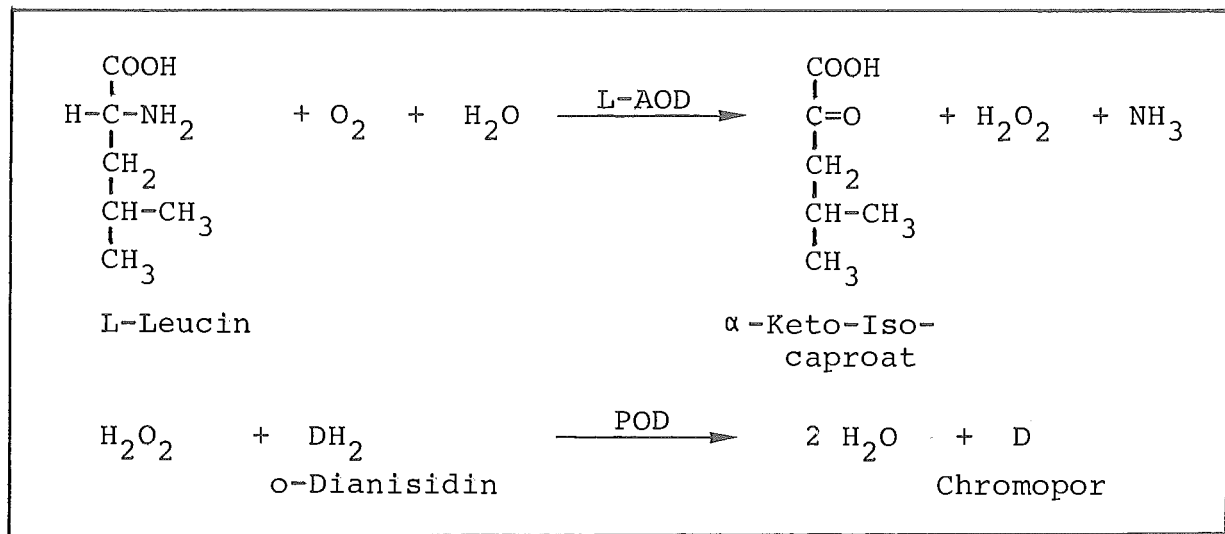


Abb. 3.2.: Reaktionsschema der enzymatischen L-Aminosäure Bestimmung.

3.3. Kinetische Messungen und Modellentwicklung

Um das reaktionstechnische Verhalten einer enzymatischen Reaktion gut beschreiben zu können, ist es notwendig, die Aktivität des Enzyms bei unterschiedlichen Randbedingungen zu ermitteln. Bei Gültigkeit der Michaelis-Menten-Kinetik genügt die Ermittlung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit R_0 :

$$\lim_{U \rightarrow 0} R = R_0 \quad (3.1.)$$

in Abhängigkeit von den Größen, welche die Reaktion beeinflussen.

Verfahrensweise bei den kinetischen Messungen

Bis auf das Enzym wurden sämtliche Reaktionspartner in Wasser gelöst, und die erhaltene Lösung wurde auf den für die Messung gewünschten pH-Wert mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. Die Konzentration der einzelnen Lösungen der Reaktionspartner wurde so eingestellt, daß später nach Mischung der einzelnen Lösungen der Reaktionspartner die gewünschte Konzentration im Reaktionsgemisch eingestellt wer-

den konnte. Die Coenzym-Lösung und die Enzymlösung wurde jeden Tag frisch hergestellt und während des Tages mit Eis gekühlt, um eine Desaktivierung so weit wie möglich zu vermeiden.

Bei jedem kinetischen Versuch wurde wie folgt verfahren:

- Alle Reaktionskomponenten bis auf das Enzym wurden zusammengegeben und gut durchgemischt.
- Das Reaktionsgemisch und die Enzymlösung wurden in einem Thermostat auf Reaktionstemperatur gebracht. Die leere Photometerküvette wurde in einem thermostatisierbaren Küvettenhalter im Photometer auf die Reaktionstemperatur gebracht.
- Das Kinetik-Auswerteprogramm ALR (siehe Anhang) wurde initialisiert. Hierzu wurde die Skalierung des X-Y-Schreibers angegeben, die Ausgleichswertemenge für den Parabelausgleich, die Schichtdicke und der Extinktionswert der zu messenden Lösung, jedoch ohne NADH, falls dies als Substrat verwendet wurde.
- Die gewünschte Menge Enzymlösung wurde nun dem Reaktionsgemisch zugegeben, das Reaktionsgemisch wurde gut gemischt und in die Photometerküvette eingefüllt.
- Schließlich wurde das Kinetik-Auswerteprogramm gestartet. Zwischen dem Start der Reaktion durch Zugabe von Enzym und dem Start der Datenerfassung vergingen zwischen 30 und 45 Sekunden, die zum vollständigen Mischen der Reaktionslösung und zum Einfüllen in die Photometerküvette benötigt wurden.
- Während die enzymatisch katalysierte Reaktion in der Küvette abläuft, wird die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der NADH-Konzentration auf dem X-Y-Schreiber gezeichnet.

Das Ergebnis einer kinetischen Messung als X-Y-Diagramm ist in Abb. 3.3. dargestellt. Die Datenpunkte bei kleinen Reaktionsgeschwindigkeiten häufen sich, da mit festem Zeitintervall gemessen wurde. Aus diesem Grund entstand ein Tintenfleck.

Vor Beginn der Messung wurde der Nullpunkt des Photometers genau eingestellt. Bei der Untersuchung der FDH wurde dies mit Reaktionsgemisch durchgeführt, dem Pufferlösung anstatt Enzym-Lösung zugesetzt wurde.

Bei der Untersuchung der anderen Enzyme wurde ein Reaktionsgemisch verwendet, welches anstatt der Coenzym-Lösung Wasser und anstatt der Enzym-Lösung Puffer-Lösung enthielt. Außerdem wurde die Anfangskonzentration des NADH bestimmt, indem die Extinktion des Reaktionsgemisches gemessen wurde, wobei wiederum anstatt Enzym Pufferlösung enthalten war.

Der genaue enzymatisch aktive Gehalt des verwendeten Coenzym wurde jeweils durch Messung der Endkonzentration (bei $R=0$) ermittelt. Bei Verwendung von FDH wurde hierzu eine 100-fach höhere Enzym-Konzentration verwendet als bei den R_0 -Messungen, um in ausreichender Zeit alles NAD^+ umzusetzen.

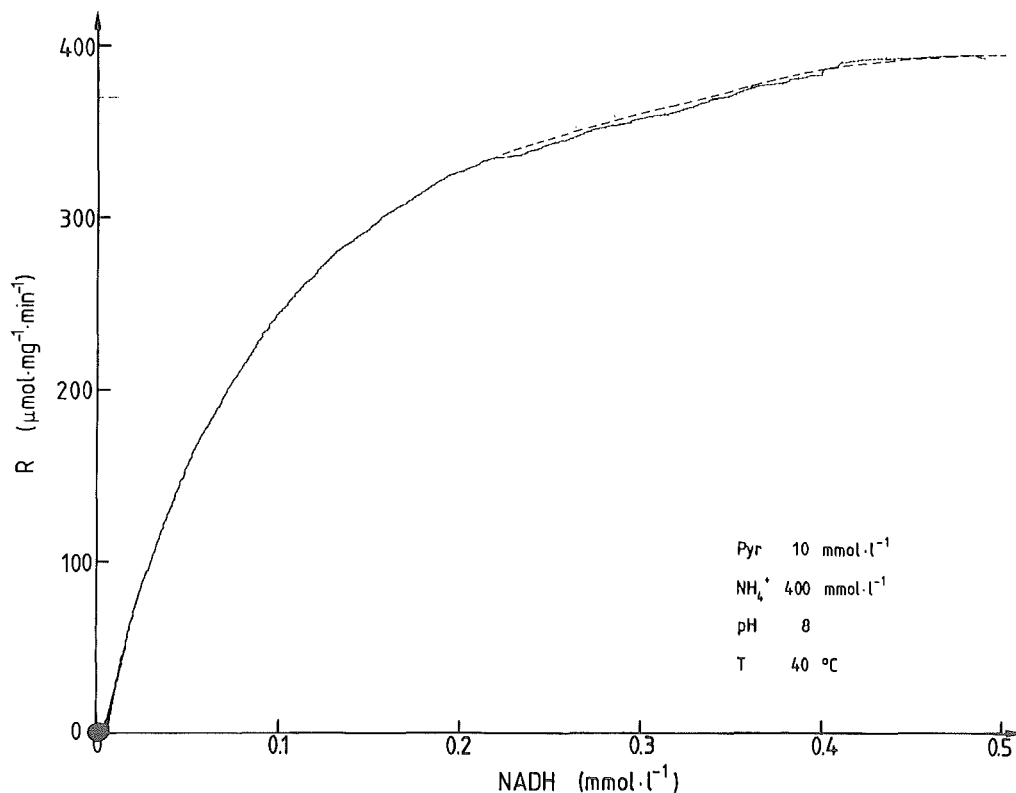


Abb. 3.3.: On-line Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit
X-Y-Schreiber Diagramm.

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wird durch graphische Extrapolation auf C_0 aus dem R-C-Verlauf ermittelt. Eine solche graphische Extrapolation ist als gestrichelte Linie in Abb.

3.3. gekennzeichnet. Anstatt diese Extrapolation graphisch (von Hand) durchzuführen, was bei genügend kleiner Reaktionsgeschwindigkeit meist genau genug ist, kann die Extrapolation auch numerisch durchgeführt werden. Hierzu werden aus dem R-C-Verlauf bezüglich der Konzentration äquidistant liegende Wertepaare ausgewählt. Mit einem Programm, zur nichtlinearen Regression, werden durch Anpassung eines geeigneten kinetischen Modells an diese Daten kinetische Konstanten ermittelt. Durch Einsetzen der Anfangskonzentration in das optimierte kinetische Modell kann R_0 bestimmt werden.

Der Einfluß des pH-Wertes und der Temperatur auf die Aktivität der Enzyme wurde untersucht. Der pH-Wert, bei dem die kinetischen Untersuchungen durchgeführt wurden, wurde im Hinblick auf die kontinuierliche Prozeßführung im Enzym Membran Reaktor ausgewählt. Dabei war ein Kompromiß zwischen dem pH-Optimum der Formiat Dehydrogenase und der als zweites Enzym verwendeten Dehydrogenase herzustellen. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen wurden in Gegenwart von Phosphatpuffer durchgeführt, um eine pH-Verschiebung während der Reaktion zu vermeiden.

Aus dem Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde nach Arrhenius die Aktivierungsenergie berechnet. Dabei wurden nur Meßwerte verwendet, bei denen die thermische Desaktivierung während der Meßzeit noch vernachlässigt werden konnte. Für die weiteren kinetischen Messungen wurde zunächst als Reaktionstemperatur 40°C ausgewählt, da hier für die Dauer der kinetischen Messungen noch keine thermische Desaktivierung feststellbar war. Bei den kontinuierlichen Versuchen im Enzym-Membran-Reaktor zeigte sich jedoch, daß eine Betriebstemperatur von 25°C vorzuziehen ist.

Der Temperatureinfluß auf die Kinetik wurde nun durch Korrektur von V_{\max} entsprechend der gemessenen Aktivierungsenergie berücksichtigt.

Der Einfluß der Substrate und Produkte auf die Enzymaktivität wurde durch systematische Variation jeweils eines Parameters bestimmt. Der Einfluß der Substrate und Produkte wird jeweils in einem kinetischen Modell zusammengefaßt, dessen Parameter durch nichtlineare Regression gewonnen wurden.

Der Einfluß der Produkte kann nicht nur aus Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen bei Variation der Produktkonzentration, sondern auch aus dem Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes gewonnen werden, wenn man bei bekanntem V_{\max} - und K_m -Wert die mit dem Umsatz abnehmende Reaktionsgeschwindigkeit nicht nur über den Substratabbau, sondern auch über die Produktakkumulation modellmäßig beschreibt und dabei als einzigen Optimierungsparameter die Inhibierungskonstante K_i des Produktes ermittelt, dessen korrespondierendes Substrat im Vergleich zu anderen Substraten im Unterschuß vorhanden ist.

Der Verlauf der Reaktion kann recht gut durch das optimierte kinetische Modell beschrieben werden. Für ALADH ist bei Verwendung von PEG-10 OOO-NADH noch nicht einmal die Definition einer Produktinhibierung durch PEG-10 OOO-NAD⁺ nötig.

Da für die untersuchten Systeme unter den gewählten Reaktionsbedingungen der Einfluß der Enzymkonzentration auf die beobachtete volumenbezogene Reaktionsgeschwindigkeit streng linear ist, können die bei verschiedenen Katalysatorkonzentrationen gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten einheitlich auf die Katalysatormenge umgerechnet werden.

Alle in den Darstellungen der Ergebnisse der kinetischen Messungen eingezeichneten Linien sind Ergebnisse der optimierten kinetischen Modelle. Nur bei der Darstellung des pH-Ein-

flußes auf die Aktivität der Enzyme ist die eingezeichnete Linie eine Interpolation.

Jeder Datenpunkt in den Darstellungen der verschiedensten Einflüsse auf die Enzymaktivität ist das Ergebnis eines Versuches mit on-line-Auswertung der Reaktionsgeschwindigkeit, wie sie oben beschrieben wurde. Die Reaktionsbedingungen der kinetischen Messungen sind jeweils in den Legenden der korrespondierenden Abbildungen angegeben.

3.3.1. Kinetik der FDH

Die Messungen des Einflusses des pH-Wertes auf die Aktivität der FDH ergibt ein breites Aktivitätsmaximum zwischen pH 7 und pH 9 (Abb. 3.4.).

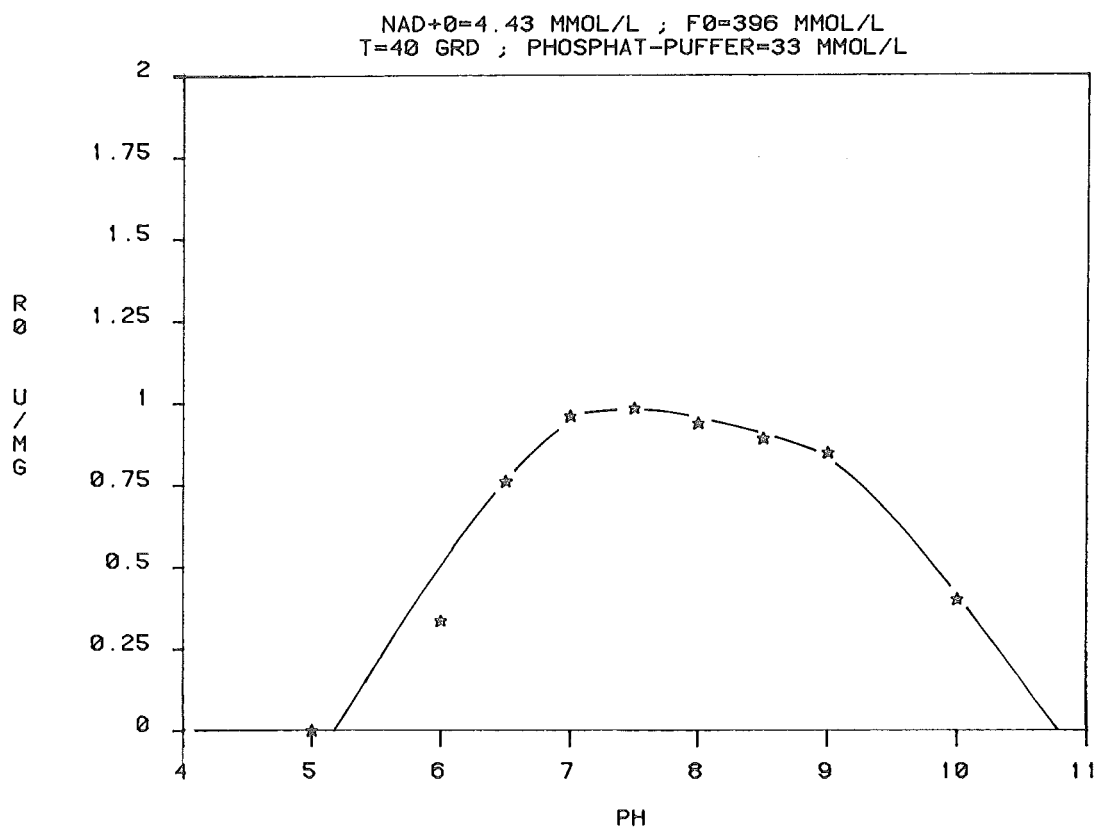


Abb. 3.4.: R_0 als Funktion des pH-Wertes.

Da die FDH in kontinuierlichen Versuchen im EMR zusammen mit ALADH bzw. LEUDH eingesetzt werden soll, wurden die kinetischen Messungen bei pH 8 durchgeführt, um die Aktivität beider Enzyme (vgl. auch 3.3.2. und 3.3.3.) gut zu nutzen. pH 8 ist ebenfalls ein günstiger pH in Bezug auf die Langzeitstabilität von NAD^+ und NADH (47).

Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität der FDH ist in Abb. 3.5. dargestellt.

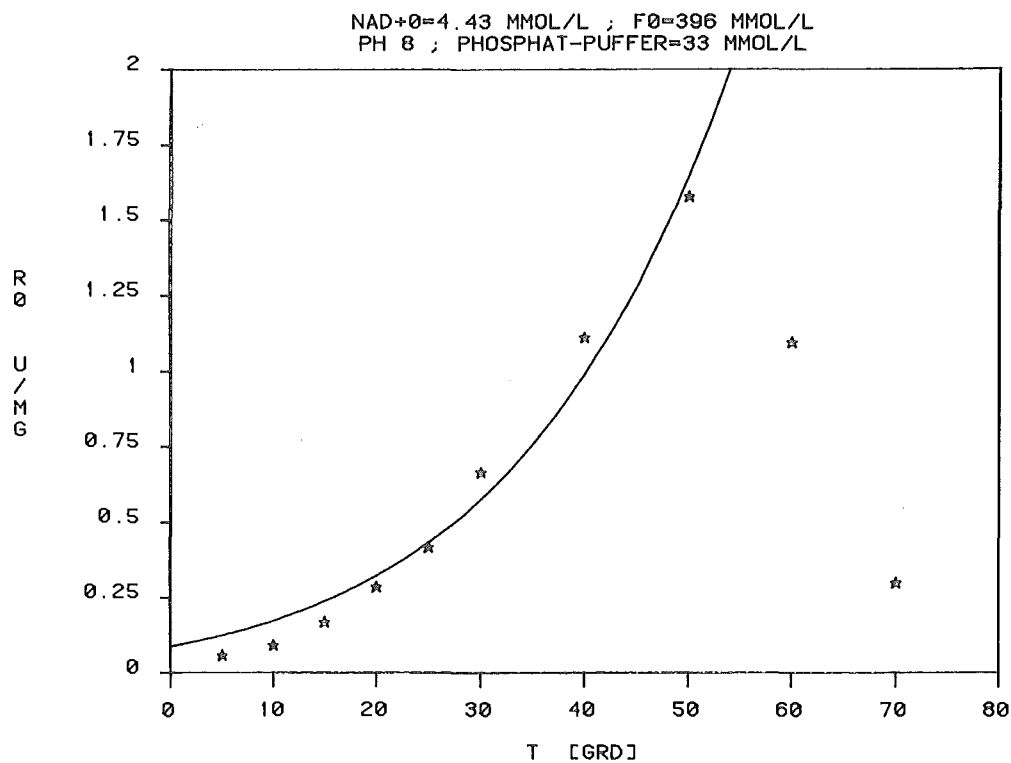


Abb. 3.5.: R_0 als Funktion der Temperatur.

Es ergibt sich bis $T = 50^\circ\text{C}$ ein Verhalten nach Arrhenius, oberhalb dieser Temperatur nimmt die Desaktivierung des Enzyms stark zu. Die weiteren Messungen zur Kinetik der FDH wurden bei 40°C durchgeführt, wobei sowohl natives als auch molekulargewichtsvergrößertes Coenzym eingesetzt wurde.

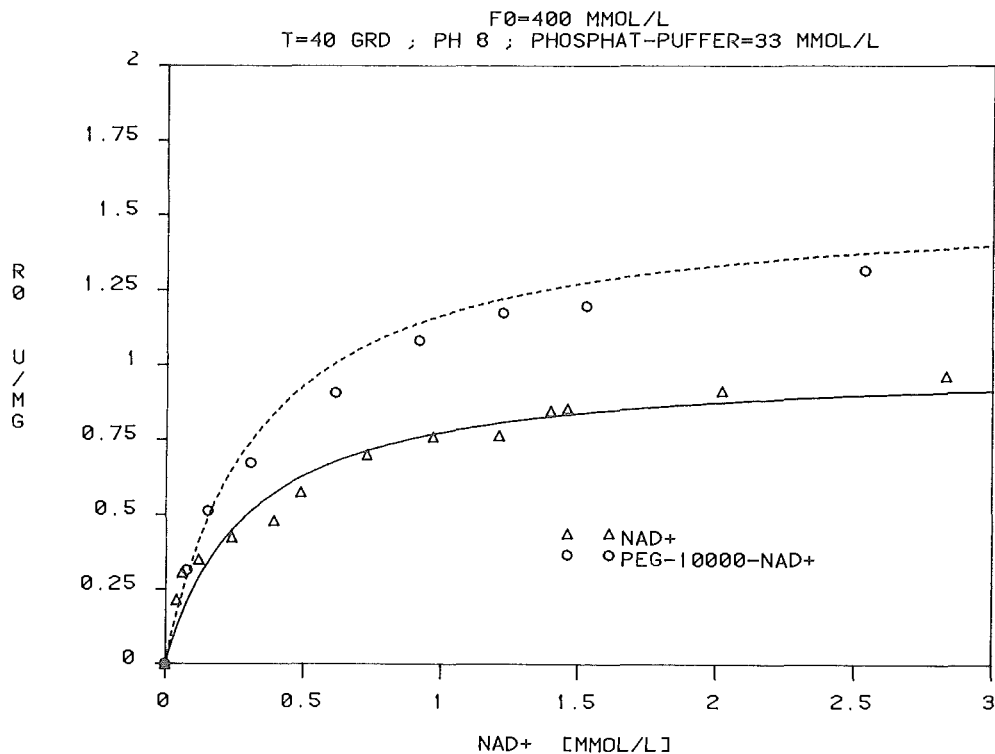


Abb. 3.6.: R_0 als Funktion der NAD^+ -Konzentration

Wie in Abb. 3.6. zu sehen ist, ergibt sich bei der Verwendung von PEG-10 000- NAD^+ eine höhere Aktivität als bei nativem NAD^+ . Der K_m -Wert dagegen unterscheidet sich nicht wesentlich. Auch nicht gebunden an NAD^+ hat PEG einen aktivierenden Einfluß auf FDH, dieser ist jedoch nicht ganz so hoch wie bei der Verwendung von PEG-10 000- NAD^+ .

Bei der Untersuchung des Einflusses der Formiat-Konzentration auf die Aktivität von FDH zeigt sich der gleiche aktivierende Einfluß, wenn an PEG-10 000 gebundenes NAD^+ verwendet wird. (Abb. 3.7.). Das Modell nach Michaelis und Menten liefert für Formiat als Substrat sehr hohe K_m -Werte, wobei im Falle des molekulargewichtsvergrößerten Coenzym eine dreimal größere Substratkonzentration im Vergleich zum nativen Coenzym erforderlich ist, um halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen.

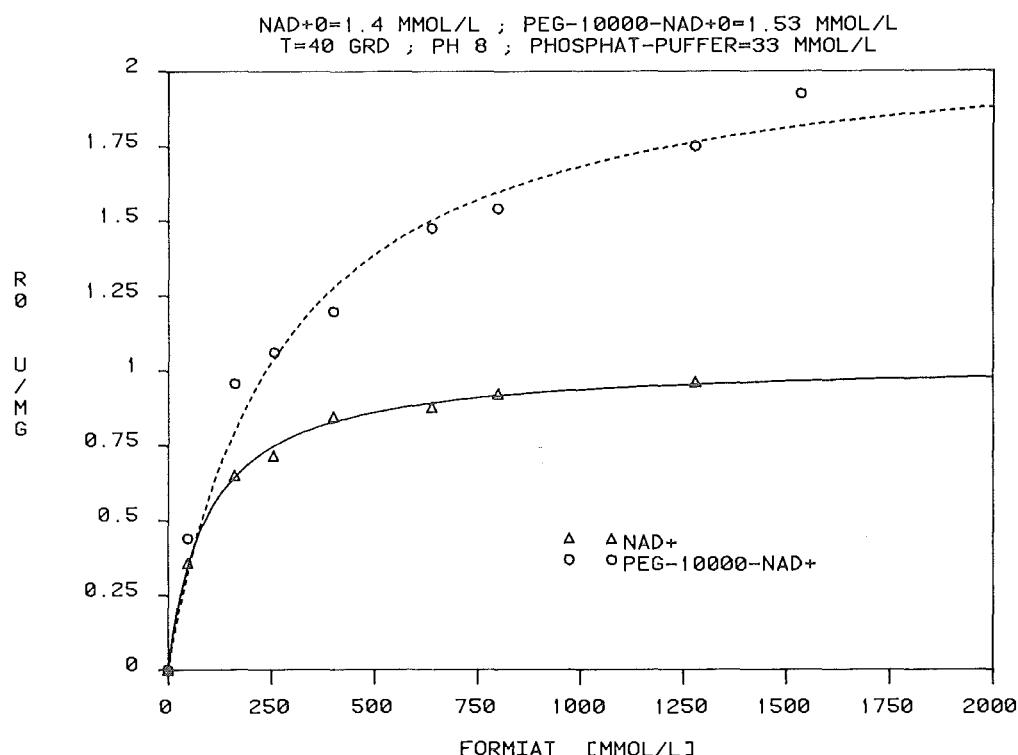


Abb. 3.7.: R_0 als Funktion der Formiat-Konzentration.

Da der K_m -Wert für Formiat zwei bis drei Größenordnungen höher ist als der des Coenzyms, ist zu vermuten, daß Formiat erst nach Bindung von NAD^+ am Enzym gebunden wird. Die Bindung von Formiat ist bei Konzentrationen unter 10 mmol/l geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion.

Die kompetitive Produktinhibierung durch NADH bzw. PEG-10 000-NADH ist recht stark, wie in Abb. 3.8. und Abb. 3.9. zu sehen ist. Bei Verwendung von nativem Coenzym wurden R_0 -Messungen unter Variation der Produktkonzentration durchgeführt. Der Grad der Inhibierung durch PEG-10 000-NADH wurde aus einem Integralrun ($R=f(U)$) (vgl. Kapitel 2.2.2.) bestimmt.

Die Inhibierung der Reaktion durch CO_2 ist vernachlässigbar. In Tab. 3.1. ist das zur Anpassung der kinetischen Daten verwendete Modell und sind die durch nichtlineare Regression erhaltenen kinetischen Konstanten zusammengefaßt, die Standardabweichungen der Konstanten sind ebenfalls angegeben.

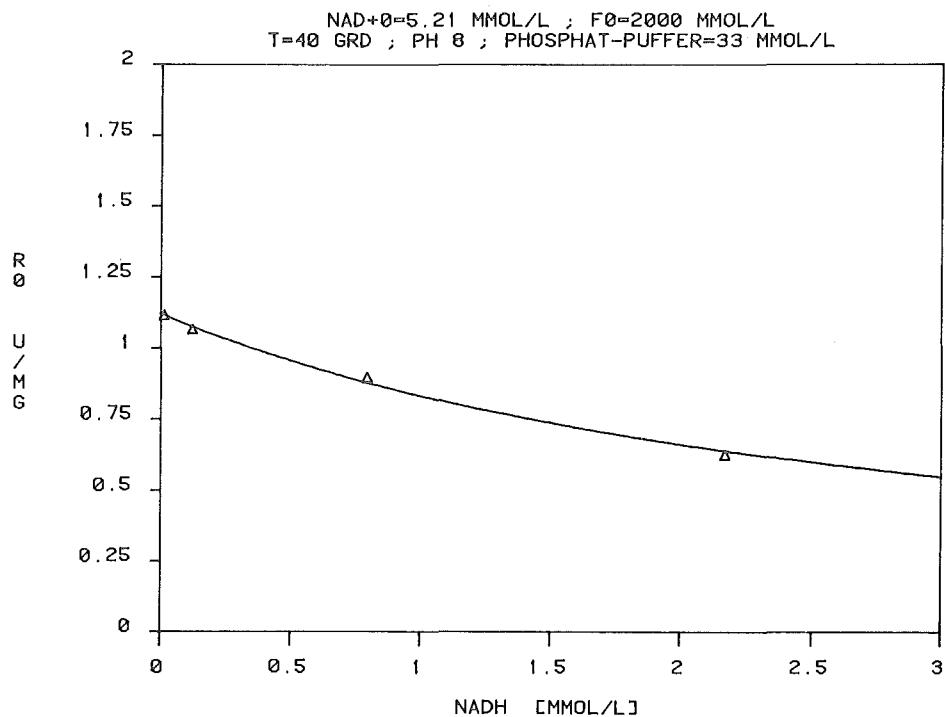


Abb. 3.8.: R_0 als Funktion der NADH-Konzentration

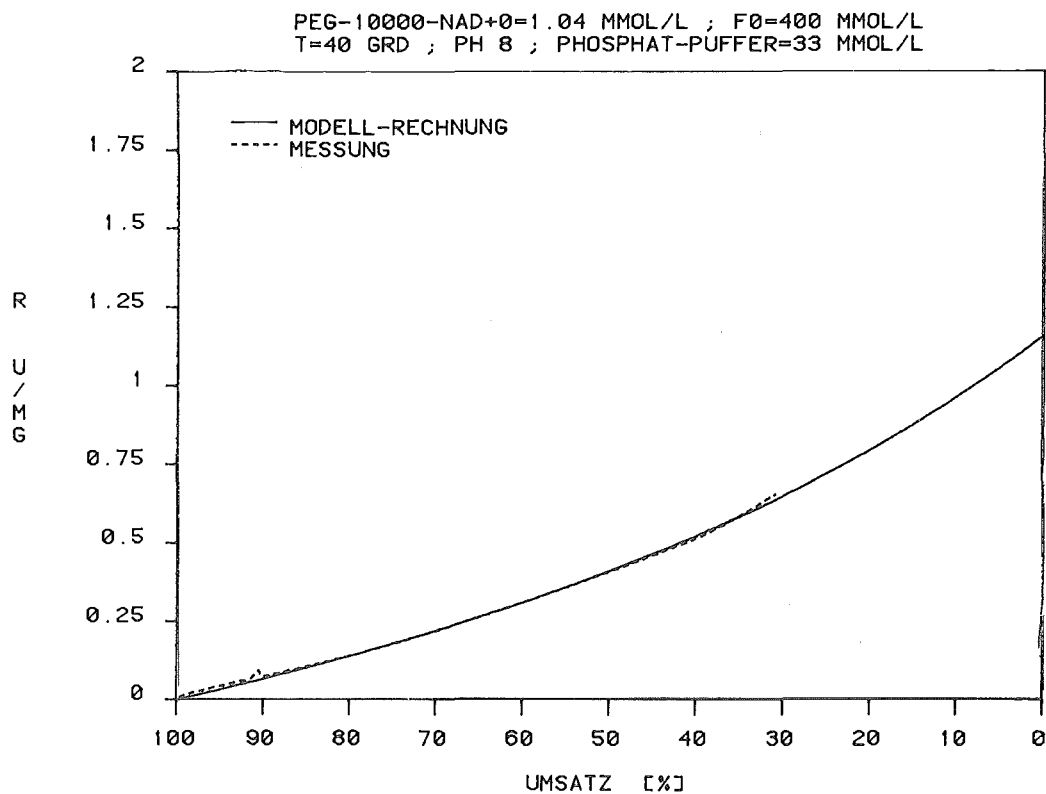
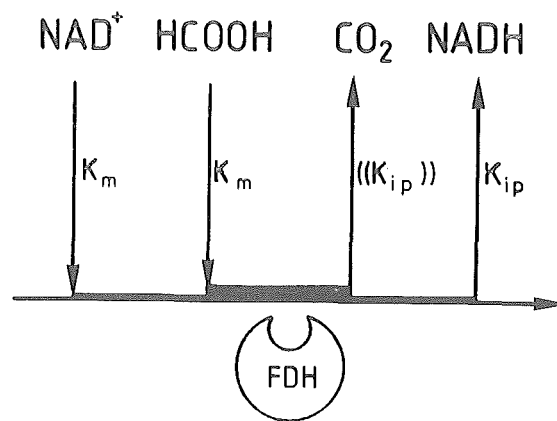


Abb. 3.9.: Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes



$$R_{FDH} = V_{maxFDH} \cdot \frac{NAD^+}{K_{mNAD^+} \cdot \left(1 + \frac{NADH}{K_{iPNADH}}\right) + NAD^+} \cdot \frac{F}{K_{mF} + F}$$

Konstante	natives NAD (H)	PEG-10 OOO- NAD (H)	Dimension	Kommentar
V_{maxFDH}	1,24 ± 0,043	2,60 ± 0,14	$U \cdot mg^{-1}$	spezifische Aktivität der FDH
K_{mNAD^+}	0,30 ± 0,041	0,33 ± 0,057	$mmol \cdot l^{-1}$	K_m NAD^+
K_{iPNADH}	0,15 ± 0,030	0,17 ± 0,0015	$mmol \cdot l^{-1}$	Kompetitive Inhibitor- konstante für NADH
K_{mF}	94,5 ± 16,5	269 ± 35,6	$mmol \cdot l^{-1}$	K_m Formiat
E_{aFDH}	42,9 ± 3,4	42,9 ± 3,4	$kJ \cdot mol^{-1}$	Aktivierungs- energie
P_{FDH}	$1,42 \cdot 10^7$ ± $1,83 \cdot 10^7$	$1,42 \cdot 10^7$ ± $1,83 \cdot 10^7$	$U \cdot mg^{-1}$	präexponen- tieller Faktor nach Arrhenius

Tab.3.1.: Kinetik der FDH bei 40 °C und pH 8.

3.3.2. Kinetik der ALADH

Die Abhängigkeit der Aktivität der ALADH vom pH-Wert des Reaktionsgemisches ist in Abb. 3.10. dargestellt.

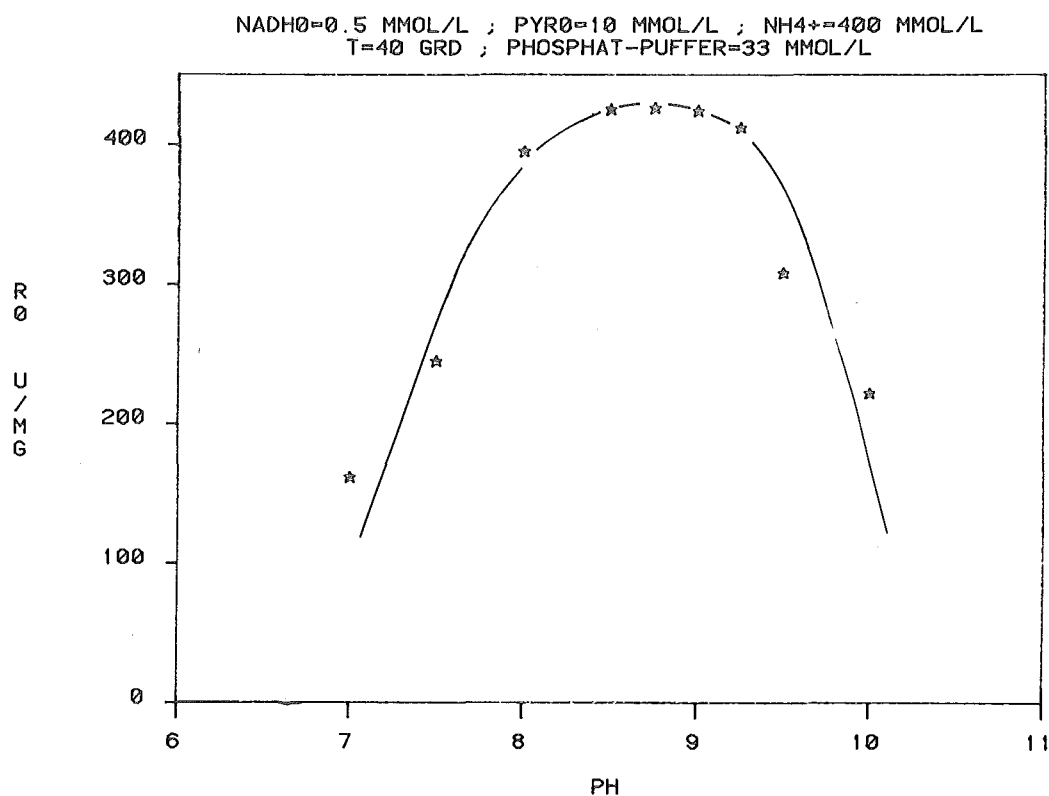


Abb. 3.10.: R_0 als Funktion des pH-Wertes.

Es ergibt sich im Vergleich zur FDH ein ins Alkalische verschobenes Aktivitätsmaximum zwischen pH 8 und pH 9,25. Alle folgenden Untersuchungen wurden wegen des Einsatzes zusammen mit FDH bei pH 8 durchgeführt.

In Abb. 3.11. ist die Temperaturabhängigkeit der Aktivität der ALADH dargestellt. Die Aktivierungsenergie für ALADH ist in der gleichen Größenordnung wie die der FDH, ALADH ist jedoch temperaturstabiler. Im weiteren Ablauf der kinetischen Messungen mit ALADH wurde 40 °C als Arbeitstemperatur gewählt und sowohl natives als auch an PEG-10 000 gebundenes Coenzym verwendet, wie bei den kinetischen Messungen mit FDH.

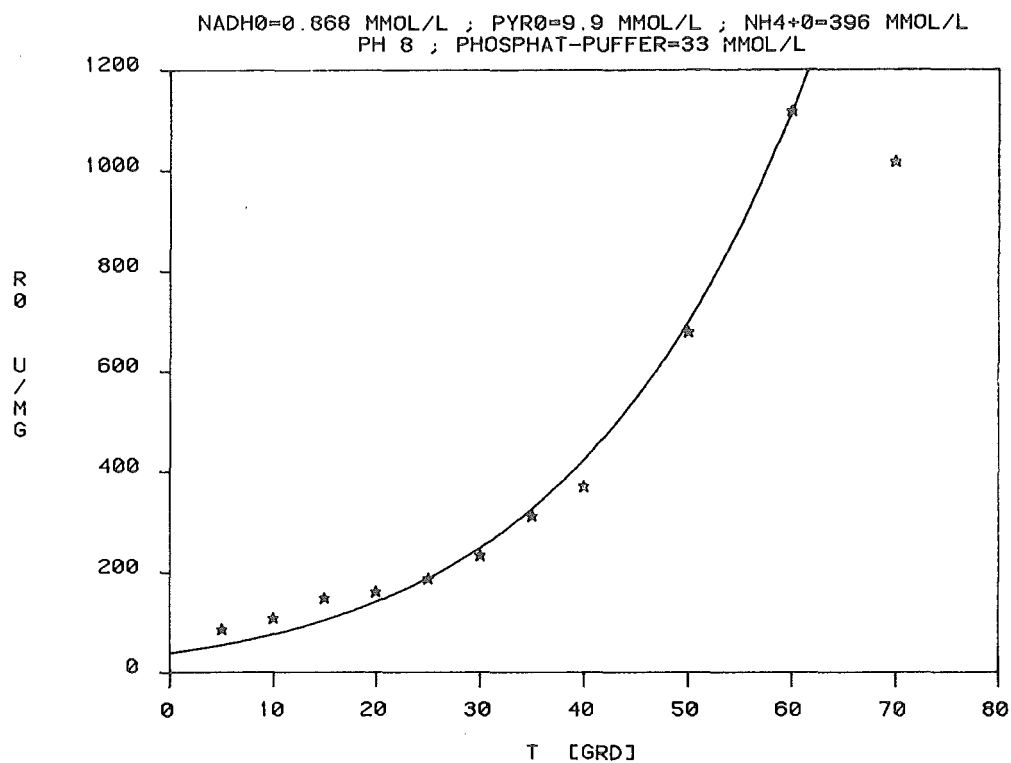


Abb. 3.11.: R_0 als Funktion der Temperatur

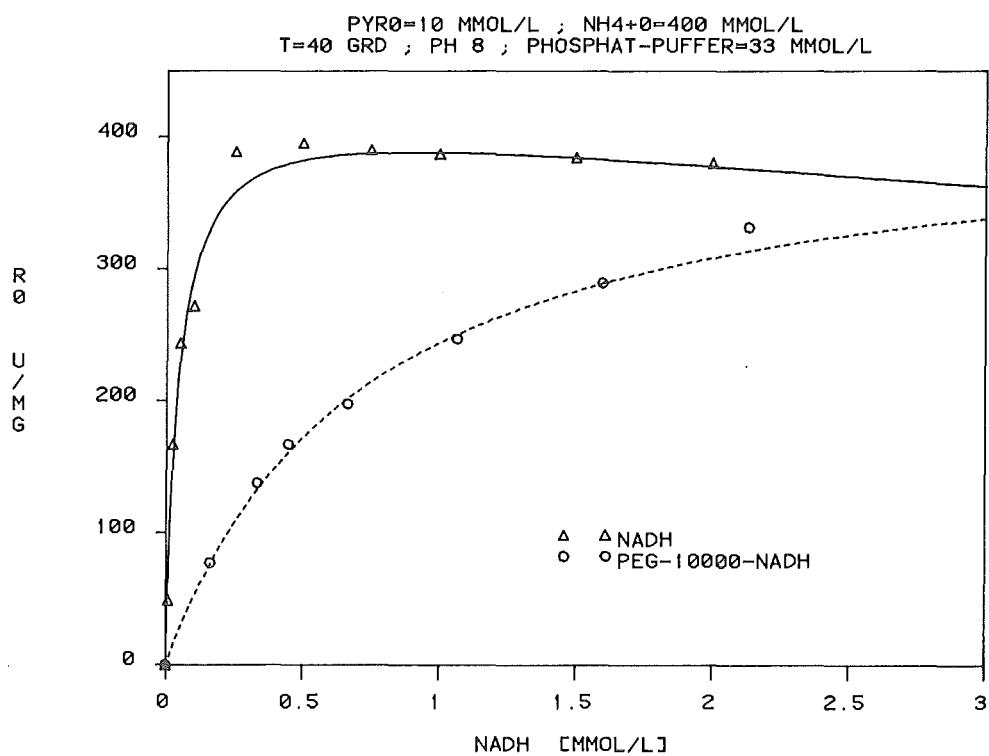


Abb. 3.12.: R_0 als Funktion der NADH-Konzentration.

Wie in Abb. 3.12. zu sehen ist, ergibt sich bei Verwendung von hohen Konzentrationen von PEG-10 000-NADH fast die gleiche Aktivität wie mit nativem NADH. Durch die Molekulargewichtsvergrößerung wird der K_m -Wert für das Coenzym im Falle der ALADH um mehr als eine Größenordnung vergrößert.

Pyruvat und Ammoniumionen zeigen eine Substratüberschußinhibition auf ALADH, wobei die Größe des Coenzym die Werte der entsprechenden kinetischen Konstanten nur wenig beeinflusst, wie in Abb. 3.13. und Abb. 3.14. zu sehen ist.

L-Alanin hat einen merklichen kompetitiv inhibierenden Einfluß auf die Aktivität der ALADH. Bei Produktkonzentrationen von 100 mmol/l und mehr, wie sie im EMR angestrebt werden, ist dieser Effekt nicht mehr zu vernachlässigen. Auch hier wirkt sich die Größe des Coenzym nicht wesentlich auf den Wert der entsprechenden Konstante aus (siehe Abb. 3.15.).

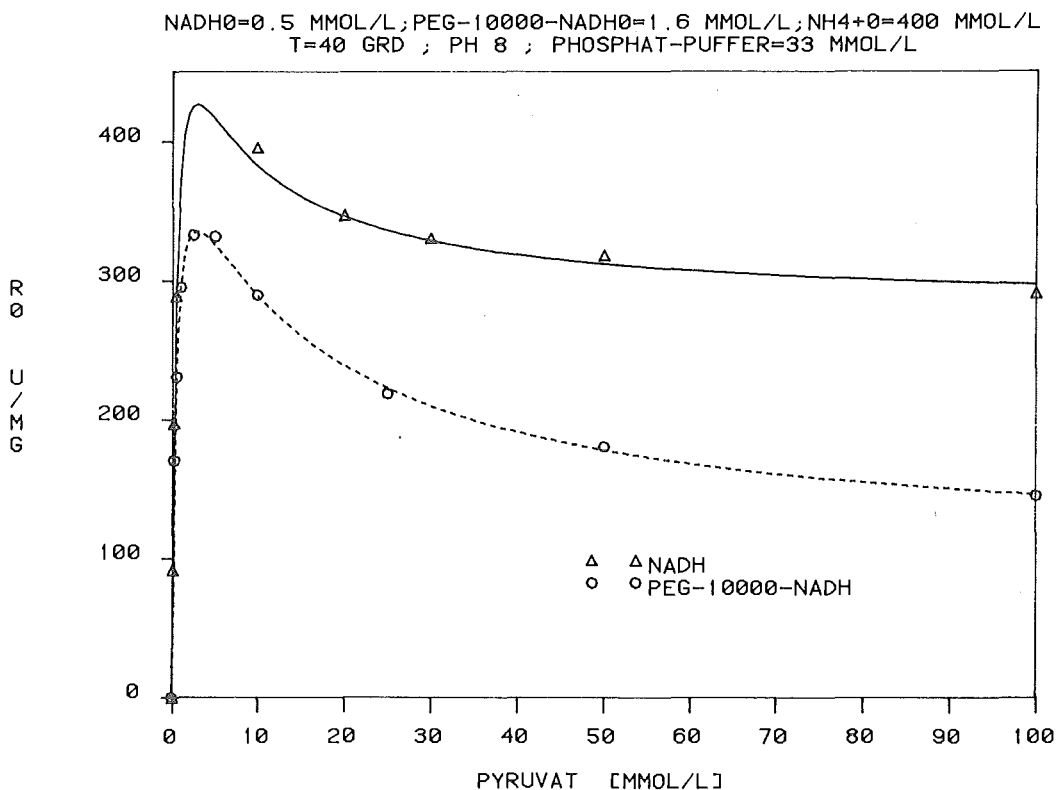


Abb. 3.13.: R_0 als Funktion der Pyruvat-Konzentration.

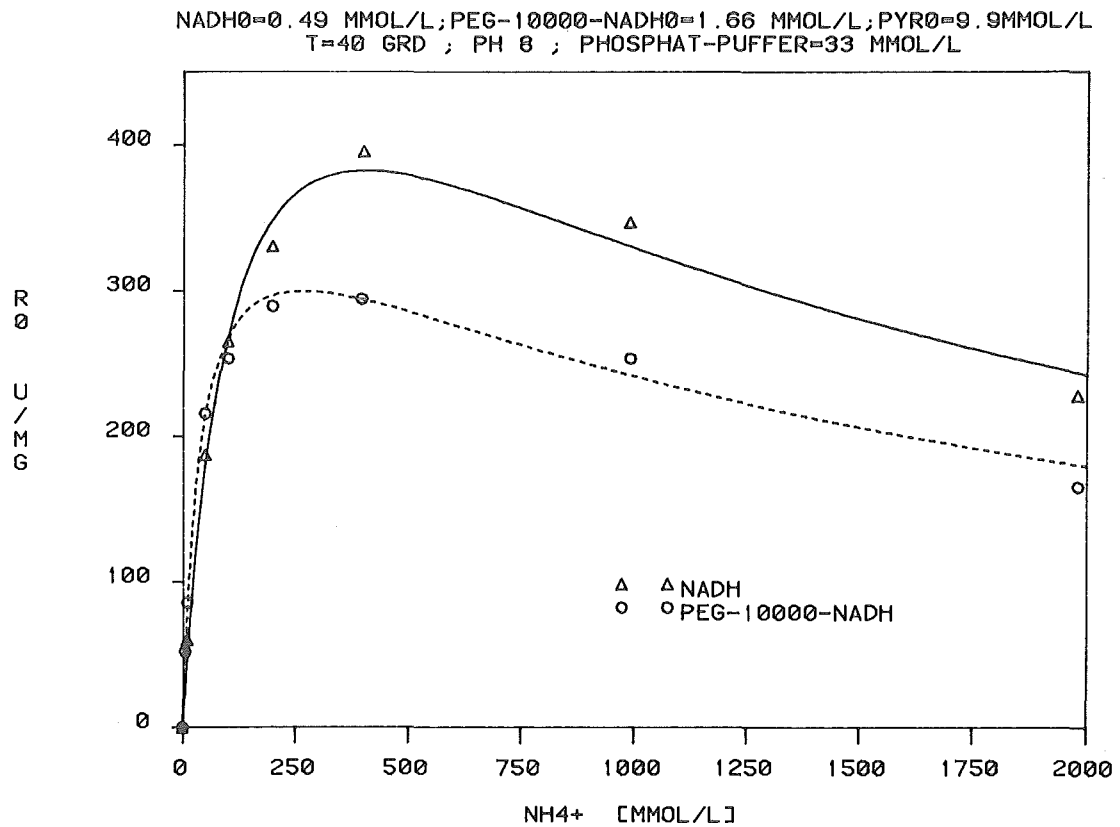


Abb. 3.14.: R_0 als Funktion der NH_4^+ -Konzentration

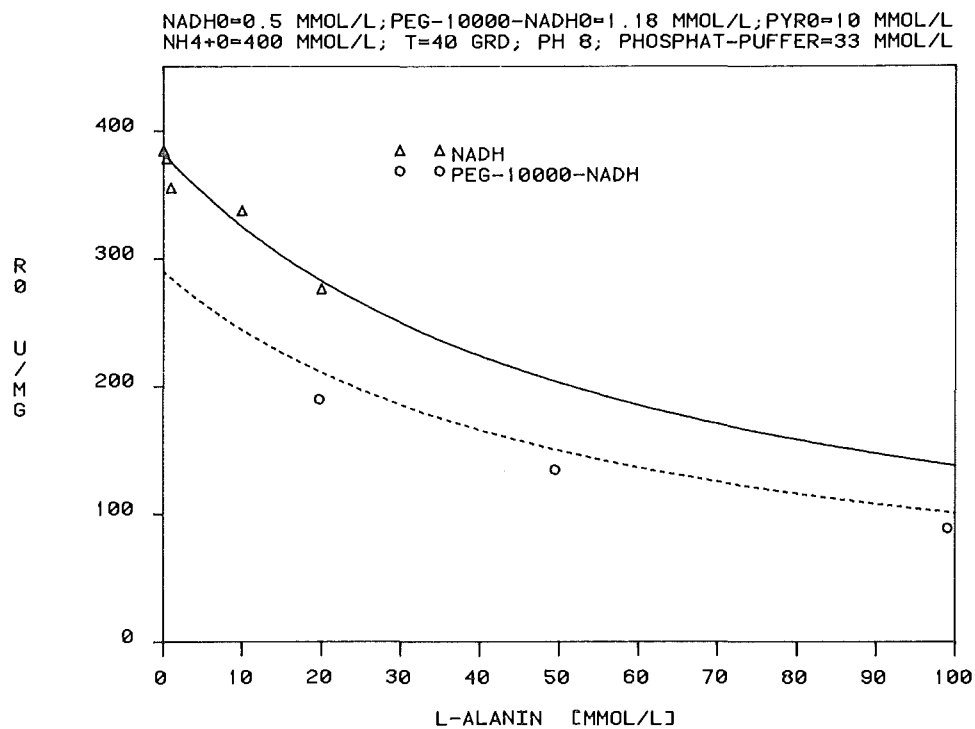


Abb. 3.15.: R_0 als Funktion der Alanin-Konzentration.

Natives NAD^+ hat, wie in Abb. 3.16. zu erkennen ist, einen mäßig inhibierenden Einfluß auf die Aktivität der ALADH. Der K_i -Wert ist ungefähr 5-mal größer als der K_m -Wert für NADH. Die Produktinhibierung durch PEG-10 OOO-NAD⁺ ist in den Konzentrationsbereichen für das Coenzym, wie sie bei EMR-Versuchen vorliegen, vernachlässigbar. Abb. 3.17. zeigt den gemessenen Verlauf von $R = f(U)$ im Vergleich zum mit dem kinetischen Modell für ALADH bei Verwendung von PEG-10 OOO-NADH berechneten Verlauf.

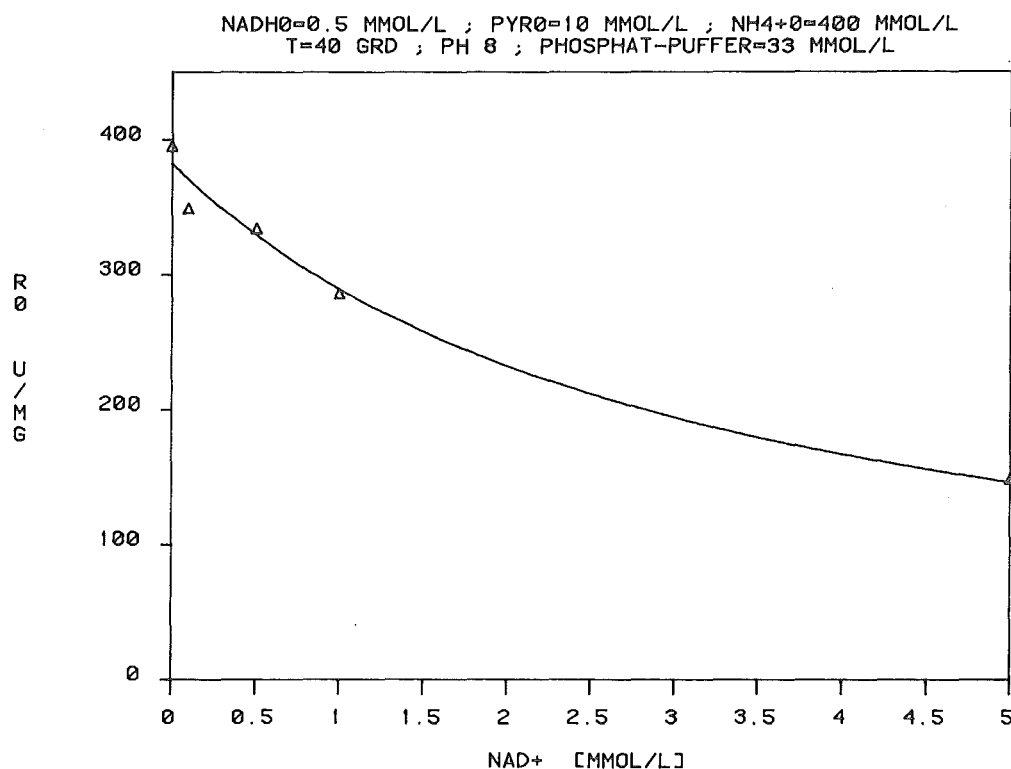


Abb. 3.16.: R_0 als Funktion der NAD^+ -Konzentration

Die Abweichung der beiden Kurvenverläufe liegt innerhalb der Meßgenauigkeit der kinetischen Messungen. In Tab. 3.2. sind das zur Anpassung der kinetischen Daten verwendete kinetische Modell, die durch nichtlineare Regression erhaltenen kinetischen Konstanten und die Standardabweichungen zusammengefaßt.

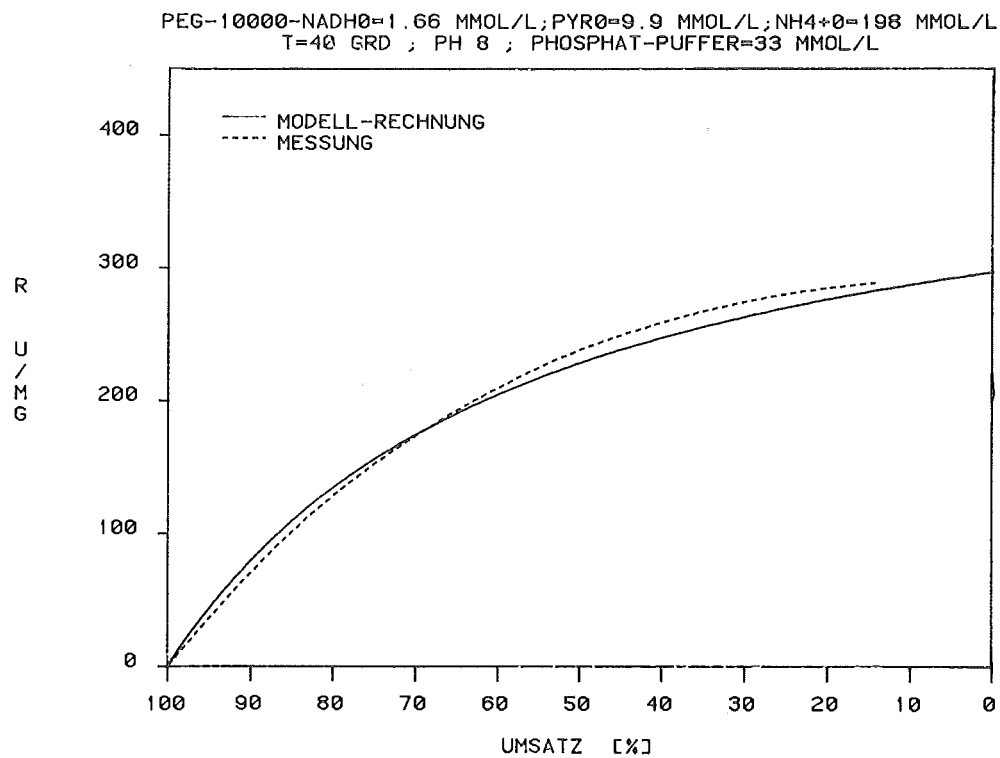
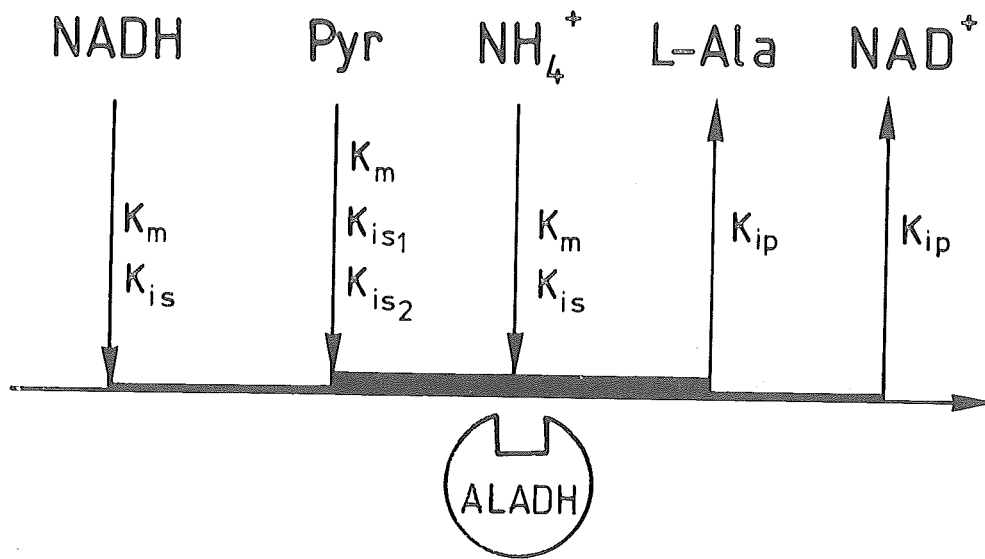


Abb. 3.17.: Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes.



$$R_{ALADH} = V_{maxALADH} \cdot \frac{NADH}{K_{mNADH} \cdot \left(1 + \frac{NAD^+}{K_{iPNAD^+}}\right) + NADH \cdot \left(1 + \frac{NADH}{K_{iSNADH}}\right)}$$

$$\cdot \frac{Pyr \cdot \left(1 + \frac{Pyr}{K_{iS1Pyr}}\right)}{K_{mPyr} \cdot \left(1 + \frac{ALA}{K_{iPALA}}\right) + Pyr \cdot \left(1 + \frac{Pyr}{K_{iS2Pyr}}\right) \cdot \frac{NH_4^+}{K_{mNH_4^+} + NH_4^+ \cdot \left(1 + \frac{NH_4^+}{K_{iSNH_4^+}}\right)}}$$

Konstante	natives NAD (H)	PEG-10 000- NAD (H)	Dimension	Kommentar
$V_{\max \text{ALADH}}$	± 996 ± 233	± 821 $\pm 43,5$	$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	spezifische Aktivität der ALADH
K_{mNADH}	$0,0439$ $\pm 0,0053$	$0,717$ $\pm 0,062$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	K_{m} NADH
K_{iSNADH}	$18,6$ $\pm 10,3$	-	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	Substrat Inhibierungskonstante für NADH
K_{iPNAD^+}	$0,244$ $\pm 0,038$	-	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	Kompetitive Inhibitor-konstante für NAD^+
K_{mPYR}	$0,482$ $\pm 0,186$	$0,395$ $\pm 0,041$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	K_{m} Pyruvat
K_{iS1PYR}	$12,4$ $\pm 7,9$	$59,4$ $\pm 8,9$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	1. Substrat Inhibierungskonstante für Pyruvat
K_{iS2PYR}	$6,15$ $\pm 4,97$	$14,7$ $\pm 2,1$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	2. Substrat Inhibierungskonstante für Pyruvat
K_{iPALA}	$1,02$ $\pm 0,24$	$1,24$ $\pm 0,12$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	Kompetitive Inhibitor-konstante für L-Alanin
$K_{\text{mNH}_4^+}$	117 ± 19	$39,7$ $\pm 3,8$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	K_{m} Ammonium
$K_{\text{iSNH}_4^+}$	1394 ± 256	1730 ± 191	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	Substrat Inhibierungskonstante für NH_4^+
E_{aALADH}	$41,9$ $\pm 1,68$	$41,9$ $\pm 1,68$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	Aktivierungsenergie
P_{ALADH}	$4,14 \cdot 10^9$ $\pm 2,57 \cdot 10^9$	$4,14 \cdot 10^9$ $\pm 2,57 \cdot 10^9$	$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	präexponentieller Faktor nach Arrhenius

Tab. 3.2.: Kinetik der ALADH bei 40 °C und pH 8.

3.3.3. Kinetik der LEUDH

In Abb. 3.18. ist die Abhängigkeit der Aktivität der LEUDH vom pH-Wert des Reaktionsgemisches dargestellt. Im Vergleich zu FDH und ALADH ist das Maximum der Aktivität noch weiter ins Alkalische verschoben, es liegt zwischen pH 9,5 und pH 10,5.

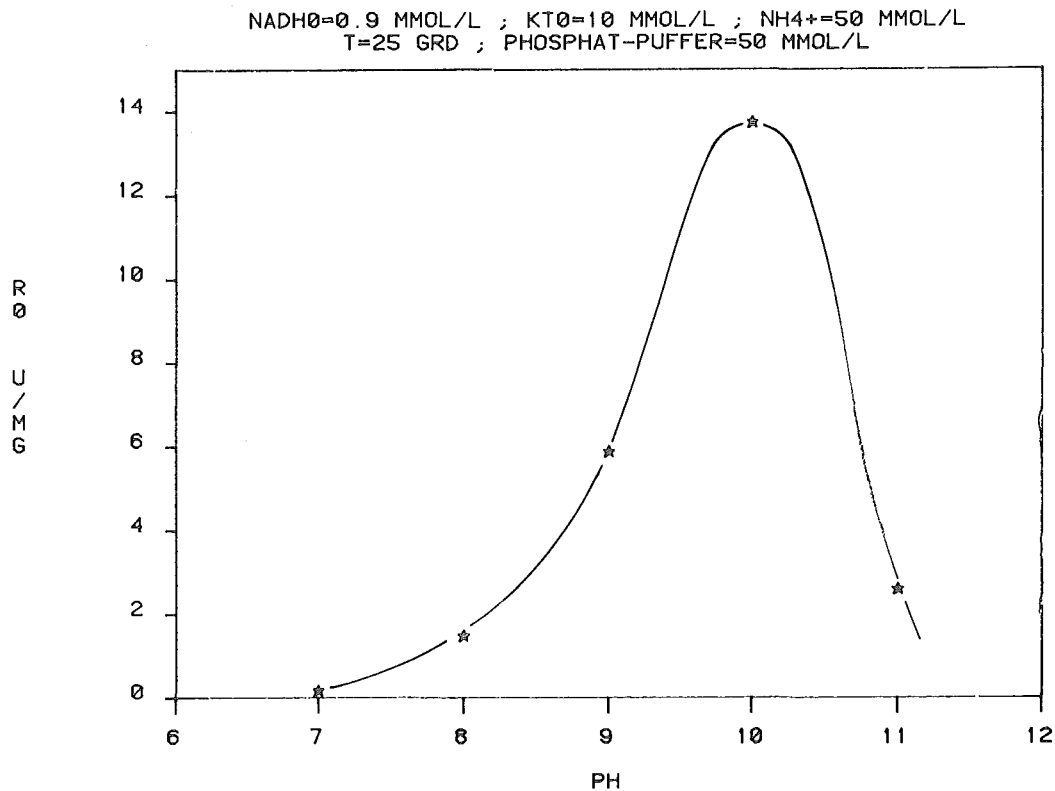


Abb. 3.18.: R_0 als Funktion des pH-Wertes.

Obwohl der bezüglich der Aktivität der LEUDH optimale pH bei pH 10 liegt, wurden die weiteren kinetischen Messungen bei pH 8 durchgeführt, da die Aktivität der LEUDH bezogen auf die Proteinkonzentration sogar bei pH 8 wesentlich höher ist als die der FDH. Um die Aktivität der FDH bei den EMR-Versuchen gut zu nutzen, wurden die kinetischen Messungen ebenso wie die EMR-Versuche bei pH 8 durchgeführt.

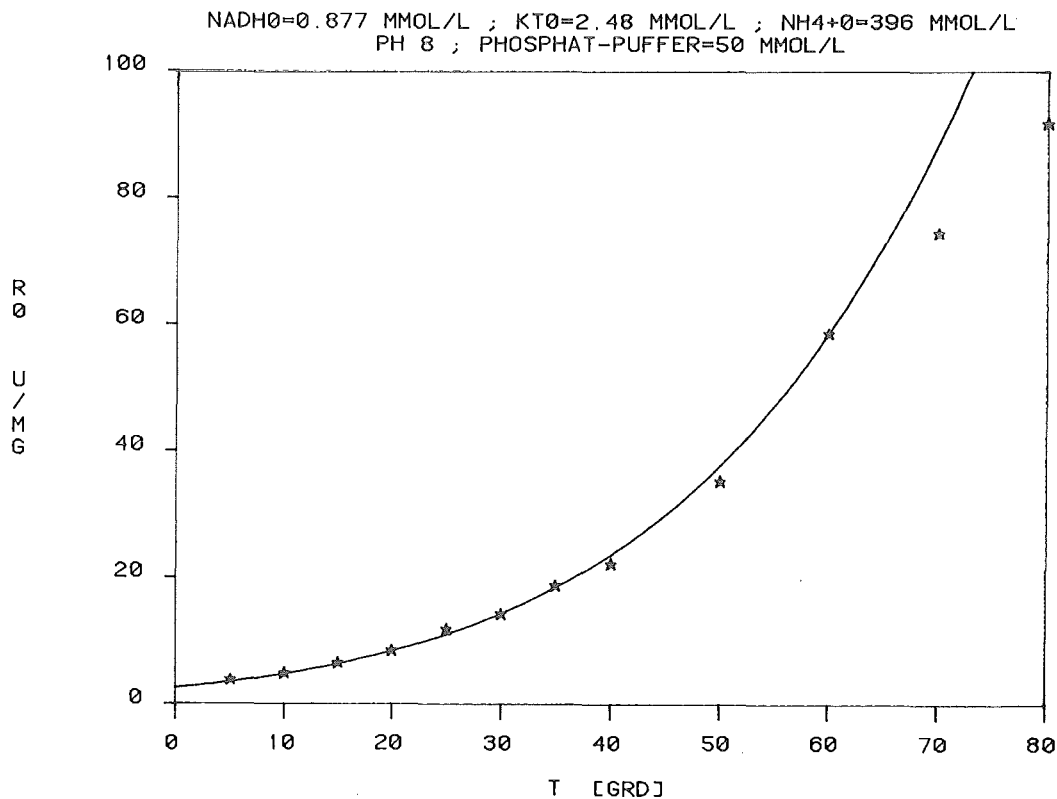


Abb. 3.19.: R_0 als Funktion der Temperatur

Wie in Abb. 3.19. zu sehen ist, ist die LEUDH recht temperaturstabil. Dies fiel schon bei der Isolierung auf, bei der Fremdprotein durch Hitzedenaturierung bei 64 °C abgetrennt wurde, was die LEUDH schadlos überstand (43). Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität konnte nur bis 80 °C verfolgt werden, da bei höheren Temperaturen das Coenzym während der Meßdauer schon merklich zerstört wird. Bis zu dieser Temperatur war noch keine merkliche Desaktivierung der LEUDH während der Meßdauer festzustellen. Die Aktivierungsenergie ist von ähnlicher Größenordnung wie der Wert, der für ALADH festgestellt wurde.

Da sich bei den ersten EMR-Versuchen zeigte, daß 40 °C als Reaktionstemperatur zu hoch ist, da FDH bei dieser Temperatur zu schnell desaktiviert, wurde trotz der hohen Temperaturstabilität von LEUDH 25 °C als Arbeitstemperatur für die kinetischen und EMR-Versuche gewählt.

Bei der Verwendung von PEG-10 000-NADH ergibt sich im Vergleich zu nativem NADH eine etwas geringere Aktivität der LEUDH, außerdem ist der K_m -Wert erhöht. Bei der Verwendung von nativem NADH zeigt sich eine leichte Substratüberschußinhibierung (Abb. 3.20).

Da der K_m -Wert für PEG-10 000-NADH bei LEUDH ebenso wie der vom nativen NADH über eine Größenordnung niedriger liegt, als der K_m -Wert vom PEG-10 000-NAD⁺ bei FDH, wird beim Einsatz der gleichen Enzymaktivitäten in einem EMR-Experiment das Coenzym überwiegend in der oxidierten Form vorliegen. Bei einem pH-Wert von über 8 steigt zwar die Aktivität der LEUDH noch stark an (siehe Abb. 3.18.), die Aktivität der FDH sinkt (siehe Abb. 3.4.) dagegen. Die Stabilität des Coenzym nimmt ab, da dieses unter den vorher genannten Bedingungen überwiegend in der oxidierten Form vorliegt (47).

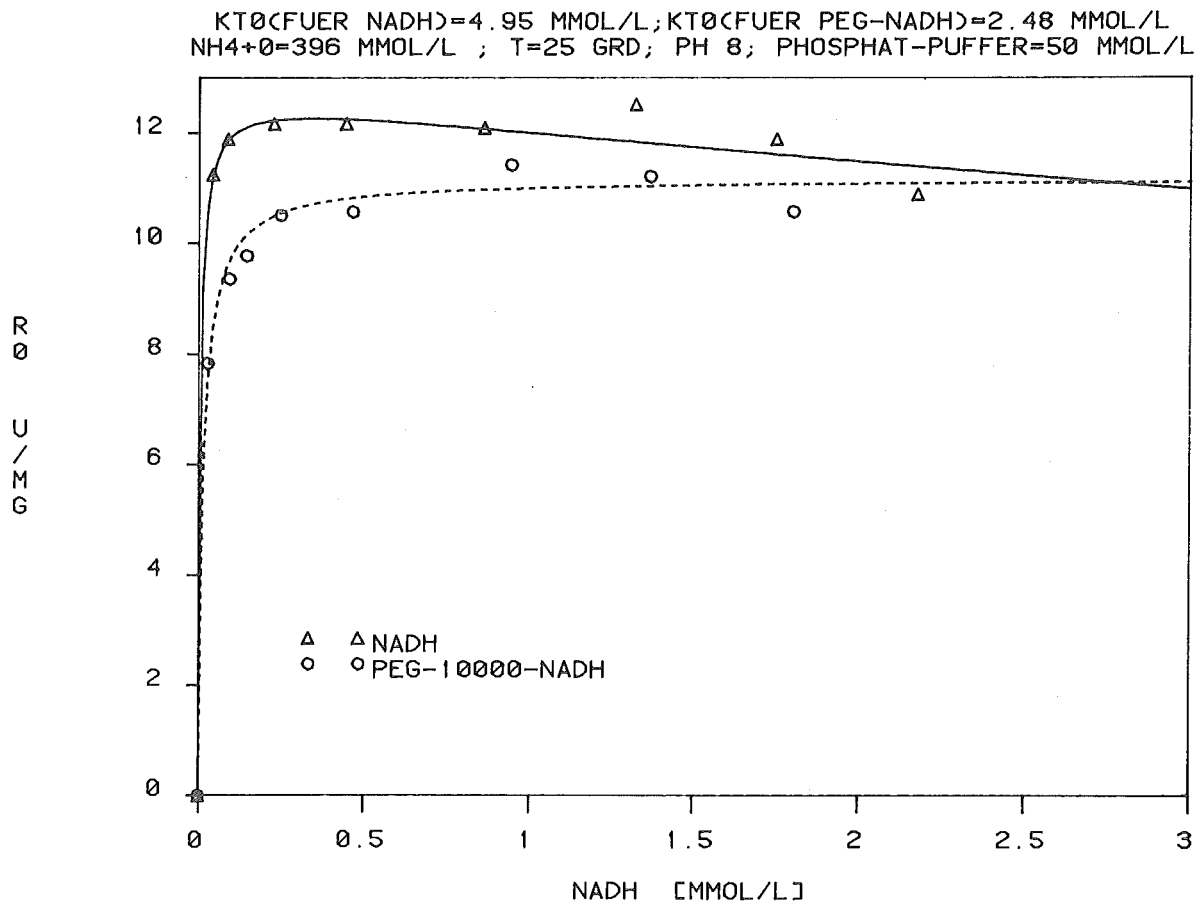


Abb. 3.20.: R_0 als Funktion der NADH-Konzentration.

Der Einfluß des α -Keto Isocaproats auf die Aktivität der LEUDH ist durch eine Substratüberschußinhibierung gekennzeichnet wie in Abb. 3.21. zu sehen ist.

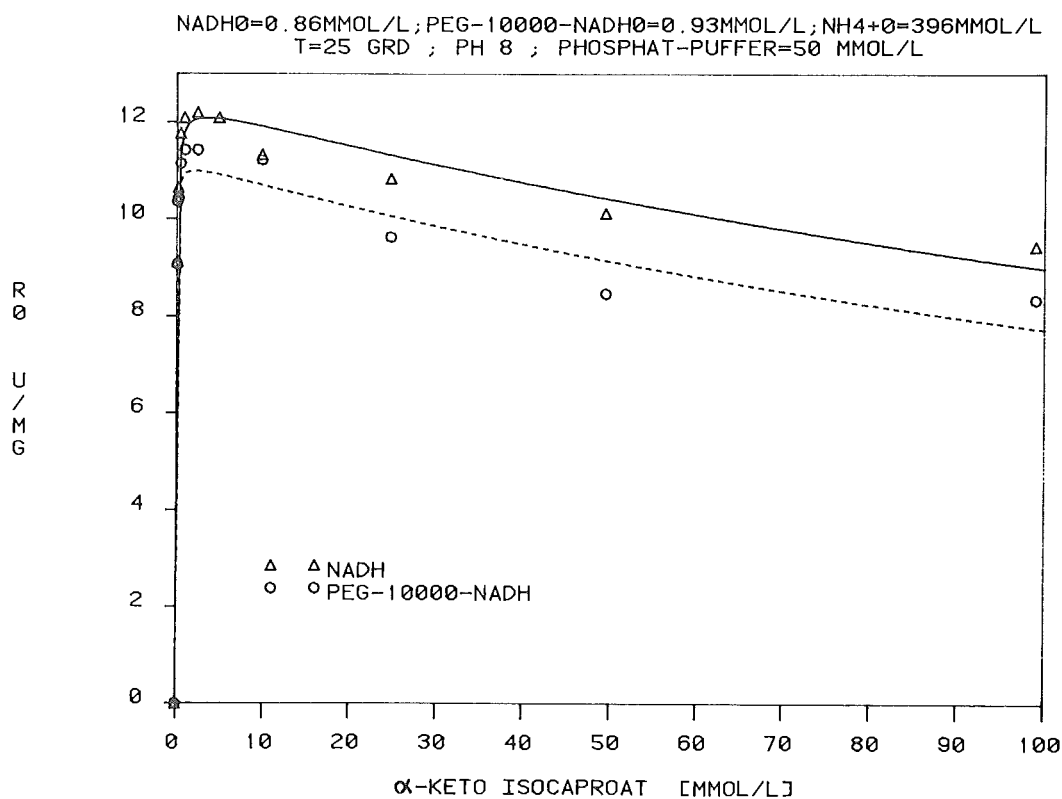


Abb. 3.21.: R_0 als Funktion der α -Keto Isocaproat-Konzentration

Bei Verwendung von nativem NADH ergibt sich ein höherer K_m -Wert für α -Keto Isocaproat als bei Verwendung von PEG-10 000-NADH, in beiden Fällen ist der K_m -Wert für α -Keto Isocaproat sehr niedrig und weniger als eine Größenordnung größer als der des Coenzyms. Die Bindung des α -Keto Isocaproat an das Enzym erfolgt also relativ gut, entsprechend ist der K_m -Wert sehr niedrig.

Ganz im Gegensatz scheint eine Absättigung des Enzyms mit Ammonium-Ionen nicht möglich zu sein, so daß es nicht mehr sinnvoll erscheint, einen K_m -Wert zu definieren. Die Bindung der Ammonium-Ionen scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein, und

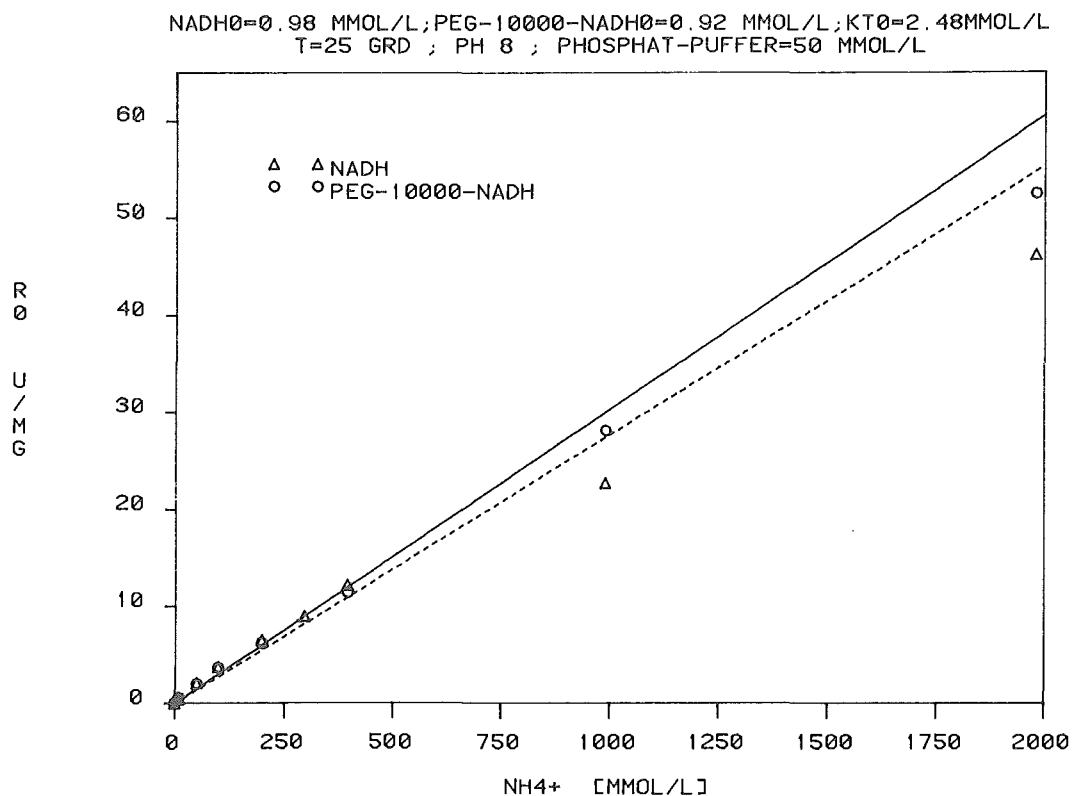


Abb. 3.22.: R_0 als Funktion der NH_4^+ -Konzentration

man kann von einer Kinetik erster Ordnung bezüglich der Ammonium-Ionen sprechen (siehe Abb. 3.22.). Man kann eine Analogie ziehen zur klassischen Kinetik heterogen katalysierter Reaktionen nach Ealey Rideal.

Die kompetitive Produktinhibierung durch L-Leucin ist bei Konzentrationen über 100 mmol/l wesentlich, wobei die Inhibierungskonstanten bei einer Verwendung von nativem NADH oder PEG-10 000-NADH in der gleichen Größenordnung liegen (siehe Abb. 3.23.).

Die kompetitive Produktinhibierung durch das oxidierte Coenzym ist wie bei ALADH relativ gering. Der K_i -Wert liegt zwischen ein und zwei Größenordnungen höher als der zugehörige K_m -Wert.

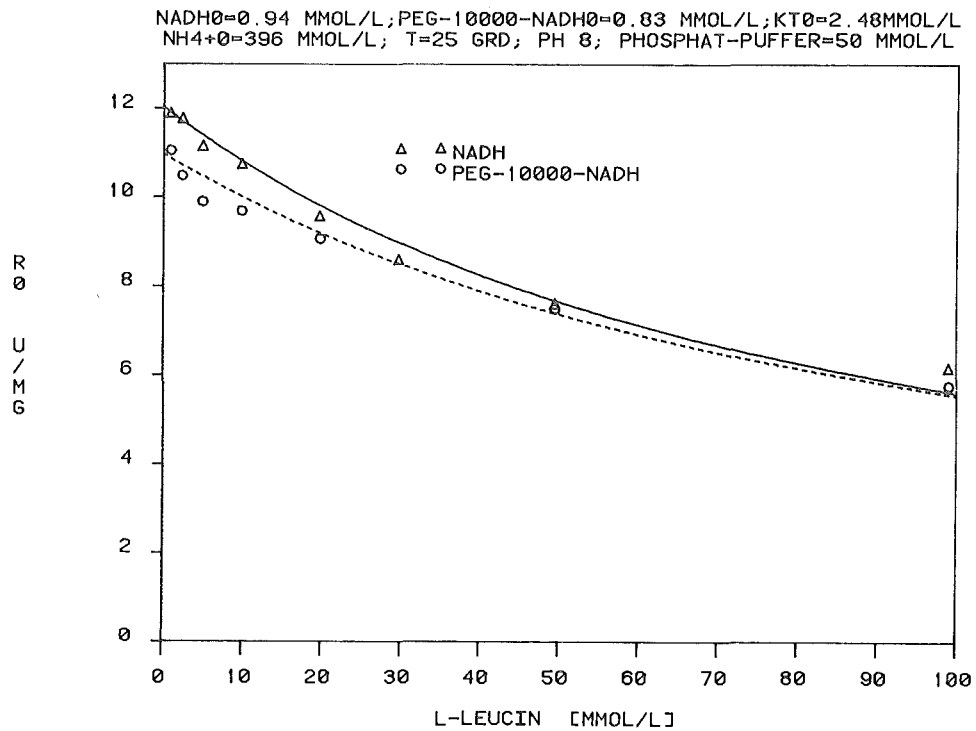


Abb. 3.23.: R_0 als Funktion der L-Leucin-Konzentration.

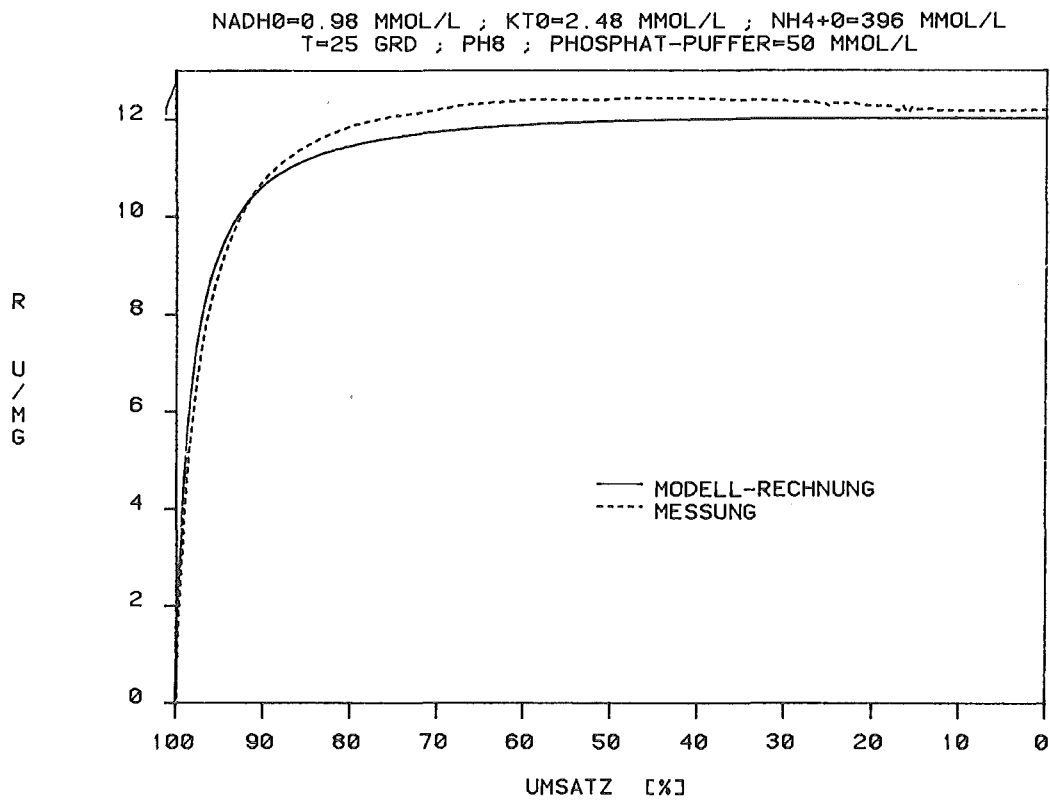


Abb. 3.24.: Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes.

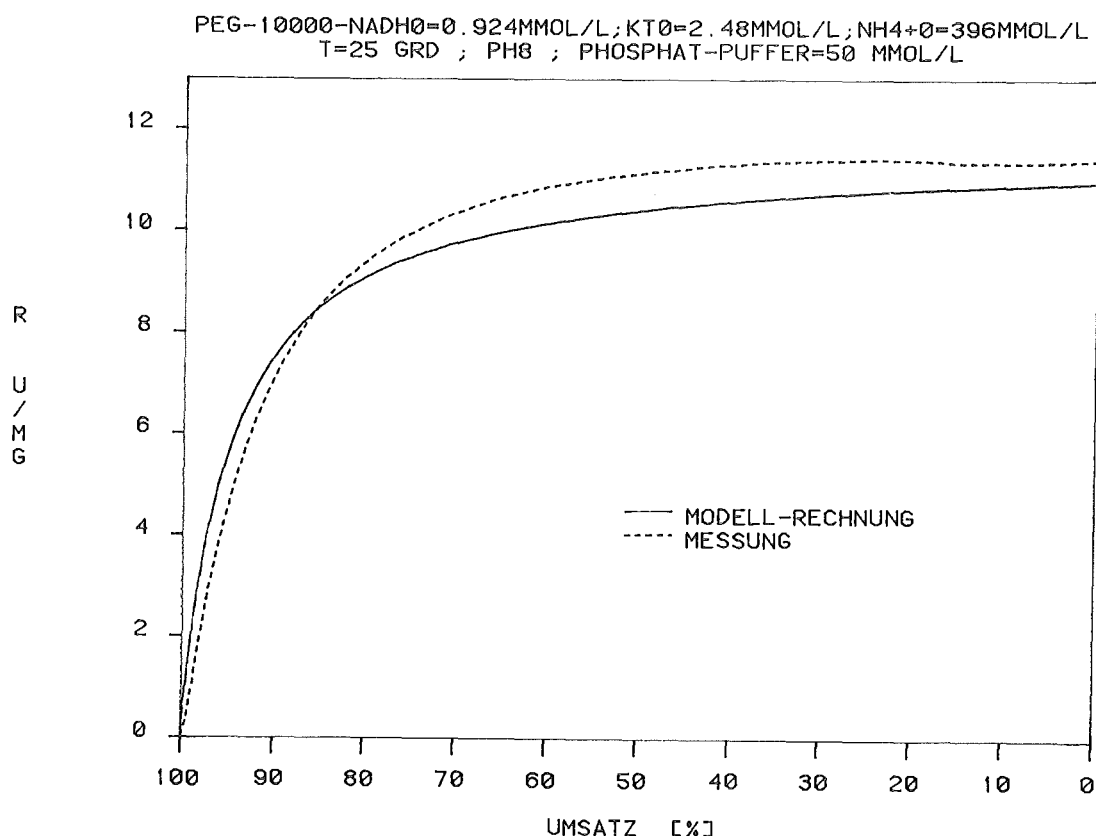
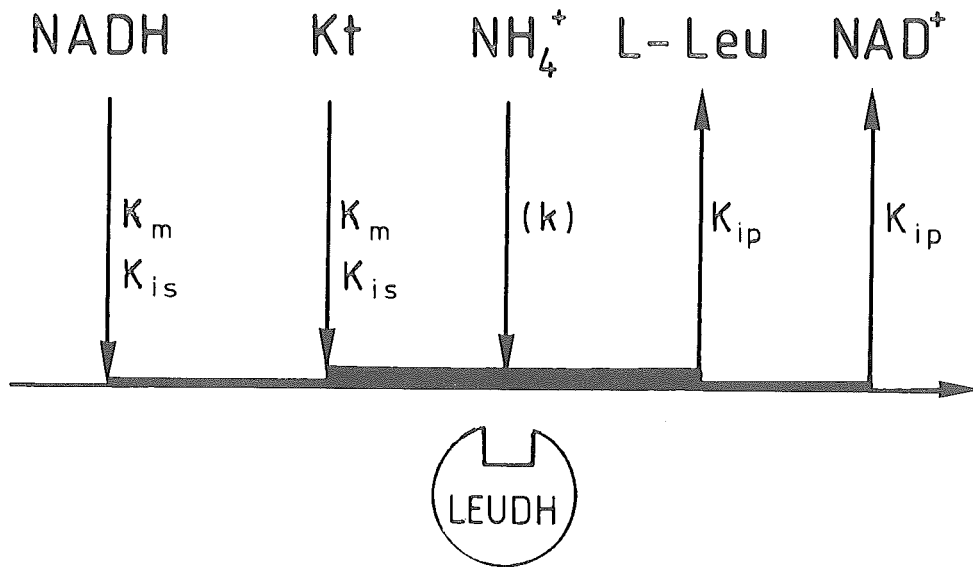


Abb. 3.25.: Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes.

Abb. 3.24. und Abb. 3.25. zeigten den gemessenen Verlauf von $R = f(U)$ im Vergleich zum mit den kinetischen Modellen für LEUDH bei Verwendung von nativem NADH bzw. PEG-10 000-NADH berechneten Verlauf. Die Inhibitor-Konstanten für das entstehende oxidierte Coenzym wurden durch Anpassung ermittelt.

In Tab. 3.3. sind das zur Anpassung der kinetischen Daten verwendete kinetische Modell, die durch nichtlineare Regression erhaltenen kinetischen Konstanten und deren Standardabweichungen zusammengefaßt.



$$R_{LEUDH} = \underbrace{k_{maxLEUDH} \cdot NH_4^+}_{V_{maxLEUDH}} \cdot \frac{NADH}{K_{mNADH} \cdot \left(1 + \frac{NAD^+}{K_{iPNAD^+}}\right) + NADH \cdot \left(1 + \frac{NADH}{K_{iSNADH}}\right)}$$

$$\cdot \frac{KT}{K_{mKT} \cdot \left(1 + \frac{LEU}{K_{iPLEU}}\right) + KT \cdot \left(1 + \frac{KT}{K_{iSKT}}\right)}$$

Konstante	natives NAD (H)	PEG-10 000- NAD (H)	Dimension	Kommentar
$V_{\max \text{LEUDH}}$	$13,2 \pm 0,35$	$11,5 \pm 0,18$	$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	spezifische Aktivität der LEUDH bei $\text{NH}_4^+ = 400 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
$k_{\max \text{LEUDH}}$	$0,0329 \pm 0,00088$	$0,0287 \pm 0,00046$	$\text{l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für LEUDH
K_{mNADH}	$0,00571 \pm 0,0023$	$0,0144 \pm 0,00268$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	K_{m} NADH
K_{iSNADH}	$19,7 \pm 9,0$	-	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	Substrat Inhibierungskonstante für NADH
K_{iPNAD^+}	$0,51 \pm 0,031$	$0,428 \pm 0,028$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	Kompetitive Inhibitor-konstante für NAD^+
K_{mKT}	$0,0456 \pm 0,0073$	$0,018 \pm 0,0052$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	K_{m} α -Keto Isocaproat
K_{iSKT}	$262 \pm 38,6$	$223 \pm 39,1$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	Substrat Inhibierungskonstante für α -Keto Isocaproat
K_{iPLEU}	$1,56 \pm 0,26$	$0,732 \pm 0,213$	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	Kompetitive Inhibitor-konstante für L-Leucin
E_{aLEUDH}	$39,4 \pm 0,99$	$39,4 \pm 0,99$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	Aktivierungsenergie
P_{LEUDH}	$8,82 \cdot 10^7 \pm 3,23 \cdot 10^7$	$8,82 \cdot 10^7 \pm 3,23 \cdot 10^7$	$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	präexponentieller Faktor nach Arrhenius

Tab. 3,3,: Kinetik der LEUDH bei 25 °C und pH 8.

LEUDH wurde für einen Vergleich des Einflusses des Molekulargewichts und der Art des Polymers unter Verwendung von PEG-20 000 und Dextran-40 000 untersucht, wie in Abb. 3.26. und Abb. 3.27. zu sehen ist. Hierbei kann als Resümee festgestellt werden, daß LEUDH bei Verwendung von PEG-20 000-NADH fast die gleiche Aktivität erreicht wie bei PEG-10 000-NADH, während bei Verwendung von Dextran-40 000-NADH die Aktivität niedriger ist.

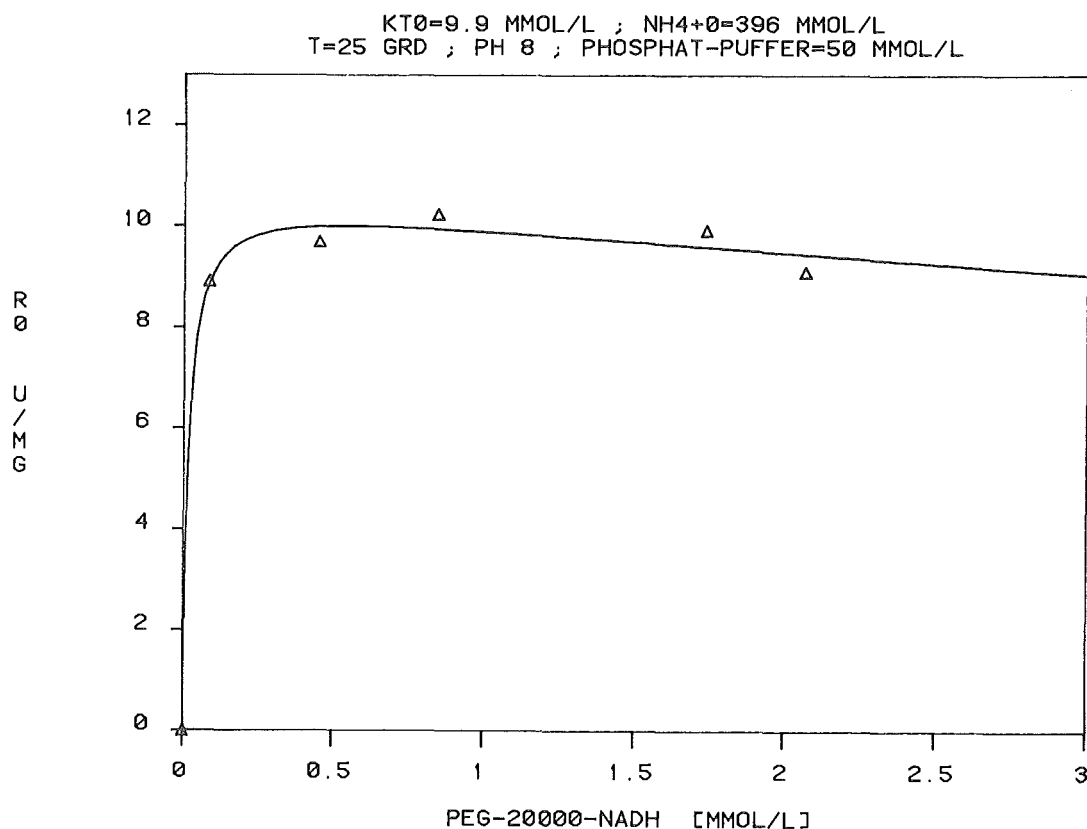


Abb. 3.26.: R_0 als Funktion der PEG-20 000-NADH-Konzentration.

Der Grund für die niedrigere Aktivität der LEUDH bei Verwendung von Dextran gebundenem NADH dürfte neben einem höheren Molekulargewicht auch in der im Vergleich zu PEG unterschiedlichen räumlichen Struktur des Polymers liegen, d.h. es sind mehr als zwei Bindungsstellen für NADH im Molekül vorhanden, und die Wahrscheinlichkeit, daß sich mehrere gebundene NADH-Moleküle gegenseitig behindern, muß in Betracht gezogen werden.

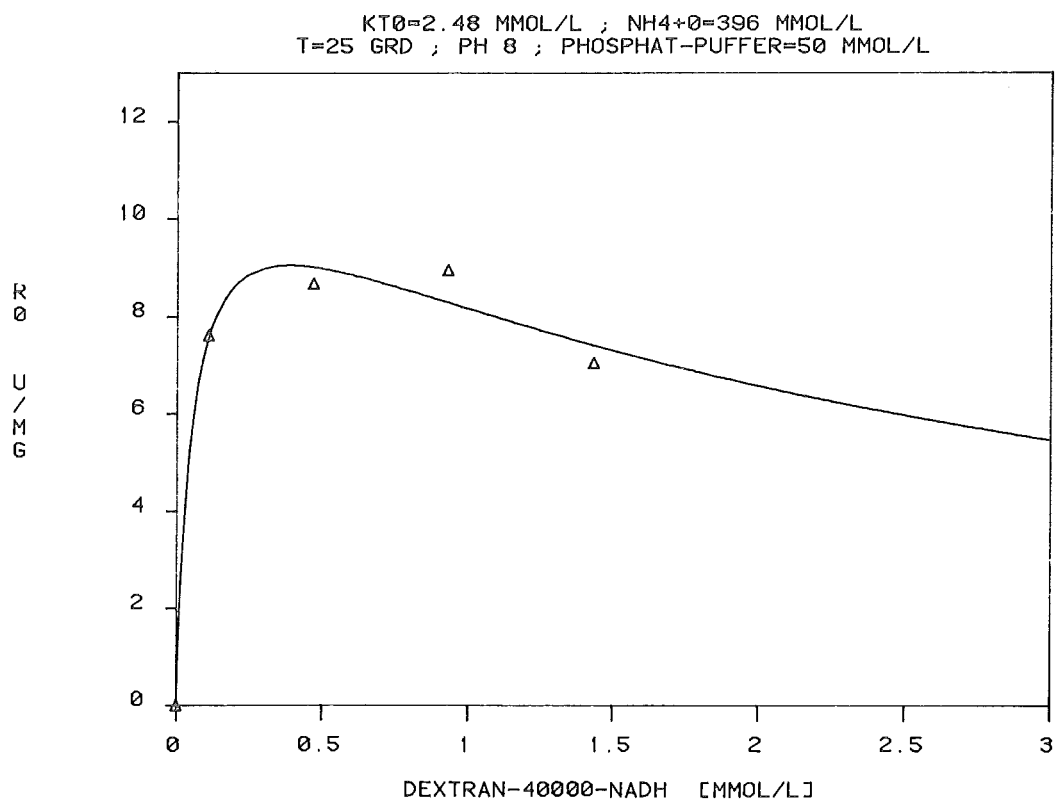


Abb. 3.27:: R_0 als Funktion der Dextran-40 000-NADH-Konzentration.

4. Theoretische reaktionstechnische Berechnungen

Bei der Verwendung von Flachmembranen als Trenneinheit kann ein Enzym Membran Reaktor für Moleküle, die die UF-Membran passieren können, als kontinuierlicher Rührkessel und für Moleküle, die die UF-Membran nicht passieren können, als Satzreaktor beschrieben werden.

Mit Kenntnis der Kinetik der FDH, ALADH und LEUDH ist es möglich, das Verhalten eines Enzym Membran Reaktors zur Produktion von L-Alanin und L-Leucin mit Coenzymregenerierung vorherzusagen. Hierzu müssen die Massenbilanzen der an der Reaktion teilnehmenden Komponenten aufgestellt werden.

Da das Coenzym an PEG-10 000 gebunden ist, wird es im Reaktor zurückgehalten, damit entfällt der Konvektionsterm für das Coenzym. Der Akkumulationsterm für das oxidierte Coenzym ist nach Vorzeichentausch gleich dem des reduzierten Coenzyms, da die eine Reaktion NAD^+ verbraucht und NADH liefert und die andere Reaktion umgekehrt NADH verbraucht und NAD^+ liefert. Die Massenbilanzen lauten wie folgt:

$$\frac{d\text{NAD}^+}{dt} = - \frac{d\text{NADH}}{dt} = R_1 \cdot E_1 - R_2 \cdot E_2 \quad (4.1.)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{(S_{10} - S_1)}{\tau} - R_1 \cdot E_1 \quad (4.2.)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{(S_{20} - S_2)}{\tau} - R_1 \cdot E_1 \quad (4.3.)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = \frac{(S_{30} - S_3)}{\tau} - R_2 \cdot E_2 \quad (4.4.)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{(P_0 - P)}{\tau} + R_1 \cdot E_1 \quad (4.5.)$$

wobei gilt:

$$R_1 = R_{\text{ALADH}} \text{ oder } R_{\text{LEUDH}}$$

$$R_2 = R_{\text{FDH}}$$

$$E_1 = E_{\text{ALADH}} \text{ oder } E_{\text{LEUDH}}$$

$$E_2 = E_{\text{FDH}}$$

$$S_1 = \text{Pyr oder Kt}$$

$$S_2 = \text{NH}_4^+$$

$$S_3 = \text{F}$$

$$P = \text{Ala oder Leu}$$

Durch instationäre Lösung der Massenbilanzen können Übergangszustände (z.B. Anfahrvorgänge) berechnet werden. Eine instationäre Behandlung ist auch erforderlich, wenn bei konstanter Verweilzeit die Auswirkung einer Enzym- bzw. Coenzymdesaktivierung berücksichtigt werden soll. Dazu wurde das Runge-Kutta-Verfahren zur Lösung von Differentialgleichungen verwendet (48).

Der stationäre Zustand kann sowohl über das Runge-Kutta-Verfahren als auch durch nichtlineare Regression berechnet werden, da alle Akkumulationsterme in den Massenbilanzen gleich Null werden. Im Falle der nichtlinearen Regression stellen der Umsatz und das Verhältnis der Konzentrationen des reduzierten zum oxidierten Coenzym die Optimierparameter dar.

Anstatt der gewichtsbezogenen Aktivität wird häufig auch die molbezogene Aktivität verwendet. Die molbezogene Aktivität gibt die in einer Zeiteinheit pro Mol Enzym produzierten Mole Produkt an, die Dimension ist also eine reziproke Zeit. In diesem Fall wird die Aktivität auch Wechselzahl oder im Englischen turn-over number genannt.

Der Vorteil dieser Art der Angabe der Aktivität ist, daß es eine vom Molekulargewicht des Enzyms unabhängige Definition der Aktivität ist. Somit lassen sich die Aktivitäten von Enzymen unterschiedlichen Molekulargewichts besser vergleichen. Es läßt sich damit auch bei coenzymregenerierenden Systemen ein leichter Vergleich durchführen, wie gut das vorhandene Coenzym genutzt wird, wenn man auch für das Coenzym eine Wechselzahl berechnet. Damit kann die Frage anschaulich beantwortet werden,

ob viele Enzym-Moleküle sozusagen "Schlange stehen", um mit einem Coenzym-Molekül einen Umsatzschritt durchzuführen, wie in Abb. 4.1. dargestellt ist oder viele Coenzyme-Moleküle "Schlange stehen", um an einem Enzym-Molekül einen Umsatzschritt vollführen zu können, wie in Abb. 4.2. zu sehen ist.

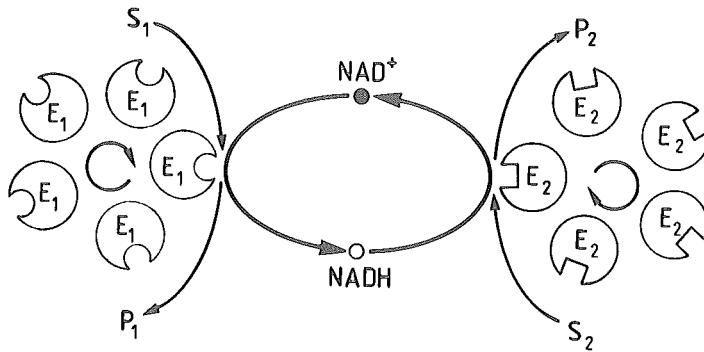


Abb. 4.1.: "Enzym Warteschlange"

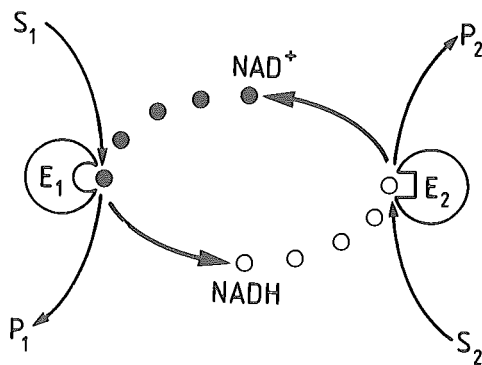


Abb. 4.2.: "Coenzym Warteschlange"

Im ersten Fall, der bei Enzymen mit sehr niedriger spezifischer Aktivität auftritt, wie bei FDH, kommt ein zusätzliches Problem hinzu. Die Coenzym-Konzentration in freier Lösung ist nicht mehr eindeutig definierbar, da ständig ein wesentlicher Anteil an Coenzym an im Überschuß vorhandenem Enzym gebunden ist.

Wenn Enzyme isoliert werden, so verlieren einige davon erheblich an Stabilität, wenn die Aufreinigung durch Beseitigung von Fremdprotein ein gewisses Maß übersteigt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Enzymen trifft dies vor allem für FDH zu (49). Es ist also nicht immer sinnvoll, alles Fremdprotein

zu beseitigen. Bei einer Messung des Proteingehalts der Enzymlösung ist es schwierig, den Prozentsatz an "reinem" Enzymprotein zu bestimmen, außerdem schwankt die Aktivität des Enzyms häufig von Präparation zu Präparation. Aus diesen Gründen dürfte es sinnvoller sein, die Enzymaktivität in U/mg Protein "der betreffenden Charge" zu definieren, als eine auf Mol bezogene Enzymaktivität als Wechselzahl anzugeben. Darum wird zur Angabe der Enzymaktivität in dieser Arbeit die Dimension U/mg Protein verwendet.

4.1. FDH - ALADH System

Die Arbeitspunkte für den stationären Zustand eines Enzym Membran Reaktors zur kontinuierlichen Produktion von L-Alanin sind in Abb. 4.3. dargestellt. Diese Arbeitspunkte ergeben sich aus dem Schnittpunkt der Konvektionsgeraden, wie sie für einige charakteristische Verweilzeiten dargestellt sind, mit der Kurve für den Reaktionsterm. Der Konvektionsterm ist im stationären Zustand des Reaktors gleich dem Reaktionsterm, da der Akkumulationsterm der Massenbilanz in diesem Fall gleich Null wird (siehe oben).

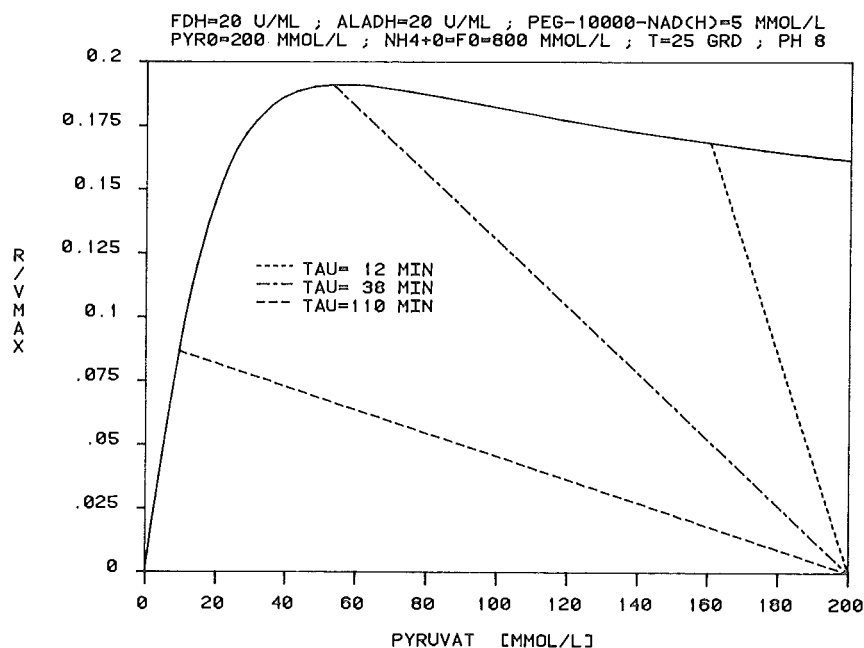


Abb. 4.3.: Dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit für das FDH-ALADH System als Funktion der Pyruvat-Konzentration.

Der Fußpunkt der Konvektionsgeraden ist die Ausgangskonzentration der Schlüsselkomponente. Die Steigung der Konvektionsgeraden ist umgekehrt proportional zur Verweilzeit. Als Abszisse wird die Konzentration der Schlüsselkomponente (Pyruvat) verwendet. Die Ordinatenwerte werden in Form einer dimensionslosen Reaktionsgeschwindigkeit angegeben, indem man die Reaktionsgeschwindigkeit R_{ALADH} auf $V_{maxALADH}$ bezieht.

Als Substrat- und Coenzym-Konzentration wurden Werte gewählt, bei denen die Aktivität der Enzyme gut genutzt, die Enzyme durch hohe Produktkonzentrationen noch nicht extrem inhibiert werden, aber schon technisch relevant sind. Bei einer Coenzym-Konzentration von 5 mmol/l wird bezüglich der Coenzym-Konzentration 94 % der FDH und 87 % der ALADH Aktivität genutzt.

Für beide Enzyme wurden jeweils 20 U/ml eingesetzt. Die Enzymnutzung bei dieser Wahl der Enzymaktivitäten kann Abb. 4.5. entnommen werden. Eine höhere Aktivität bezüglich FDH ist wegen der geringen gewichtsbezogenen Aktivität nicht sinnvoll, da bei zu hohen Proteinkonzentrationen die Gelpolarisation stark zunimmt und keine homogene Lösung mehr vorliegt, wodurch nicht mehr alles Enzym in homogener Katalyse wirken könnte.

Die Substratüberschußinhibierung der ALADH durch Pyruvat bewirkt, daß sich bei einer Substratkonzentration von 55 mmol/l oder 72,5 % Umsatz im Reaktor die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ergibt. Dieser Operationspunkt wird bei einer Verweilzeit von $\tau = 38$ min erreicht. Bei einer längeren Verweilzeit ließe sich zwar ein höherer Umsatz erzielen, jedoch würde die Nutzung der Enzyme schlechter werden. Für eine Verweilzeit von 30 min wurde nun bei gleichen Randbedingungen der Einfluß des Verhältnisses der eingesetzten Aktivitäten von FDH im Vergleich zu der von ALADH auf den Prozeß untersucht. Hierbei wurde bei konstanter Summe der Aktivitäten von 40 U/ml für FDH und ALADH, das Verhältnis der Aktivitäten zueinander variiert. In Abb. 4.4. ist der Umsatz und der Molenbruch an PEG-10 000-NADH im EMR als Funktion des "Molen-

bruchs" an FDH Aktivität dargestellt. Der Coenzym-Molenbruch an PEG-10 000-NADH ist definiert als das Verhältnis der PEG-10 000-NADH-Konzentration zur gesamten Konzentration des reduzierten und oxidierten Coenzym. Der "Molenbruch" an FDH Aktivität ist definiert als das Verhältnis der FDH Aktivität zur Summe aus FDH und ALADH Aktivität, wobei die Enzym-Aktivität sich als Produkt aus dem V_{\max} -Wert des Enzyms mit der Enzym-Konzentration ergibt.

Bei einem Verhältnis der Aktivitäten von FDH zu ALADH von 1 : 3 wird der maximale Umsatz erreicht. Man könnte erwarten, daß der höchste Umsatz bei einem Einsatz von gleicher Enzymaktivität für FDH und ALADH erreicht würde, dies ist jedoch nicht der Fall. Da FDH stark durch NADH inhibiert wird, dagegen ALADH durch NAD^+ nicht inhibiert wird, bewirkt eine hohe Konzentration an NADH im Reaktionsgemisch eine kräftige Inhibierung von FDH. Wie in Abb. 4.4. zu sehen ist, liegt beim maximalen Substratumsatz nur etwa ein Drittel des Coenzym in der reduzierten Form vor.

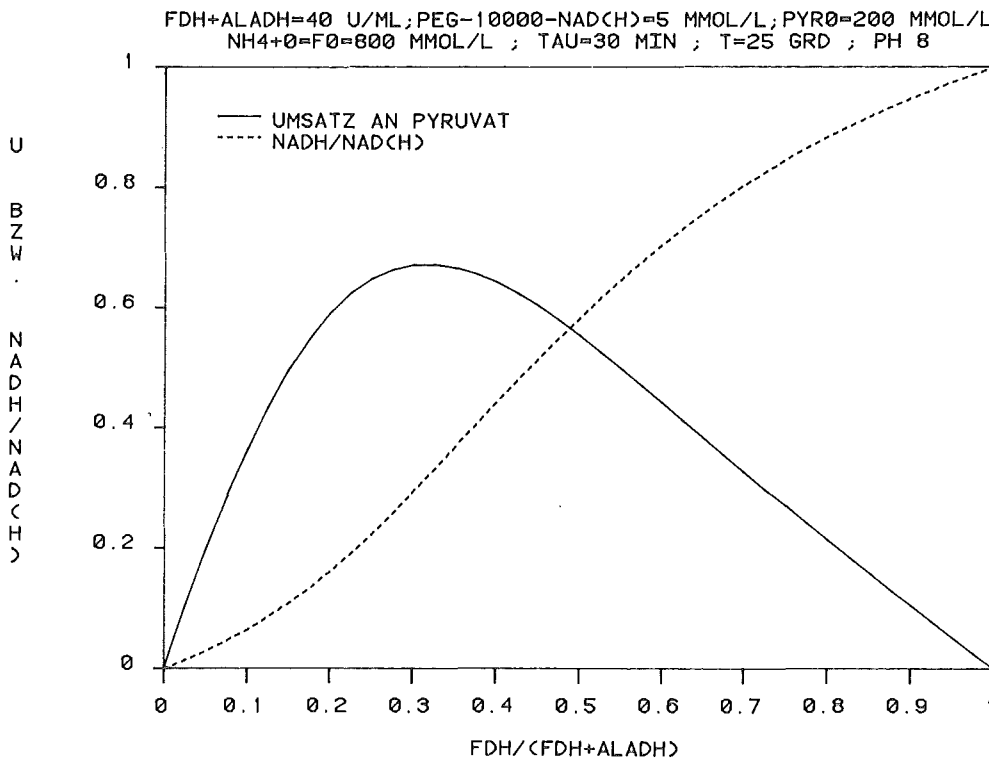


Abb. 4.4.: Umsatz und Molenbruch an PEG-10 000-NADH für das FDH-ALADH System als Funktion des "Molenbruchs" der FDH Aktivität.

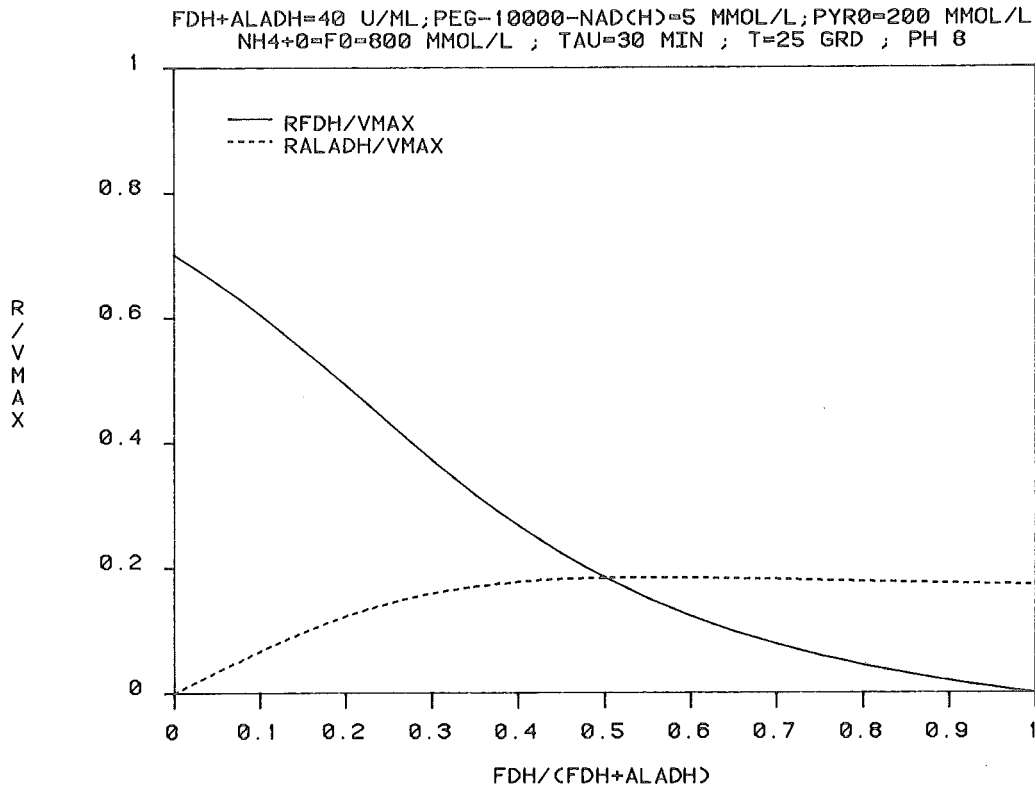


Abb. 4.5.: Dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit von FDH und ALADH für das FDH-ALADH System als Funktion des "Molenbruchs" der FDH Aktivität.

In Abb. 4.5. ist der Einfluß des FDH-"Enzym-Molenbruchs" auf die dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit von FDH und ALADH dargestellt. Die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit erreicht FDH bei unendlich kleinem "Enzym-Molenbruch". Hier geht R/V_{max} für ALADH gegen Null. Bei einem "Enzym-Molenbruch" von 1 geht der entsprechende Wert für FDH gegen Null. Die ALADH erreicht ihre maximale Reaktionsgeschwindigkeit jedoch nicht unter diesen Bedingungen, sondern bei einem "Enzym-Molenbruch" 0,6. Der Grund hierfür ist die Substratüberschußinhibierung der ALADH durch Pyruvat.

Das Verhältnis der dimensionslosen Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme ist umgekehrt proportional zu dem Verhältnis der eingesetzten Enzymaktivitäten, da die volumenbezogene Reaktionsgeschwindigkeit, mit der eine

enzymatisch katalysierte Reaktion abläuft, direkt proportional zur eingesetzten Enzymaktivität ist und im stationären Zustand des EMR die Konvektionsterme der niedermolekularen Substrate alle einander gleichen (Gleichung (4.2.) bis (4.5)).

In Abb. 4.6. und Abb. 4.7. ist der Anfahrvorgang eines EMR mit dem System FDH-ALADH dargestellt.

Abb. 4.6.

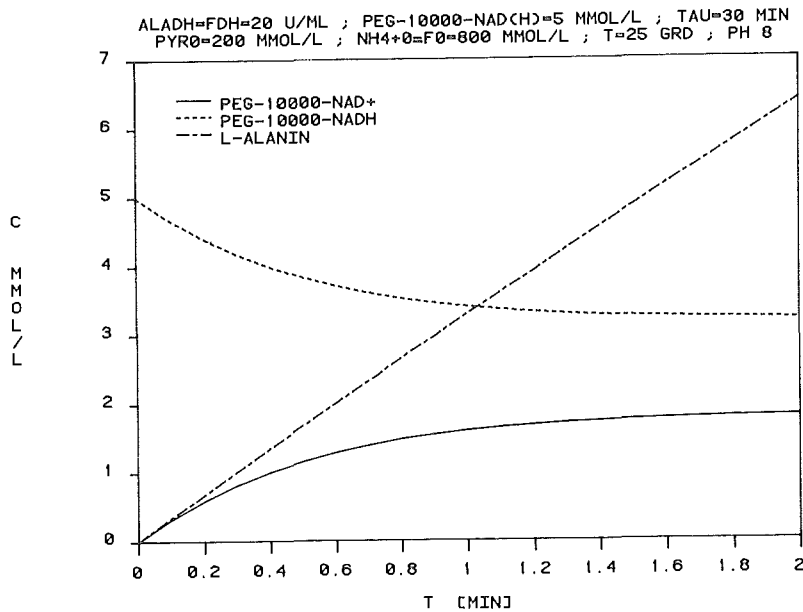


Abb. 4.7.

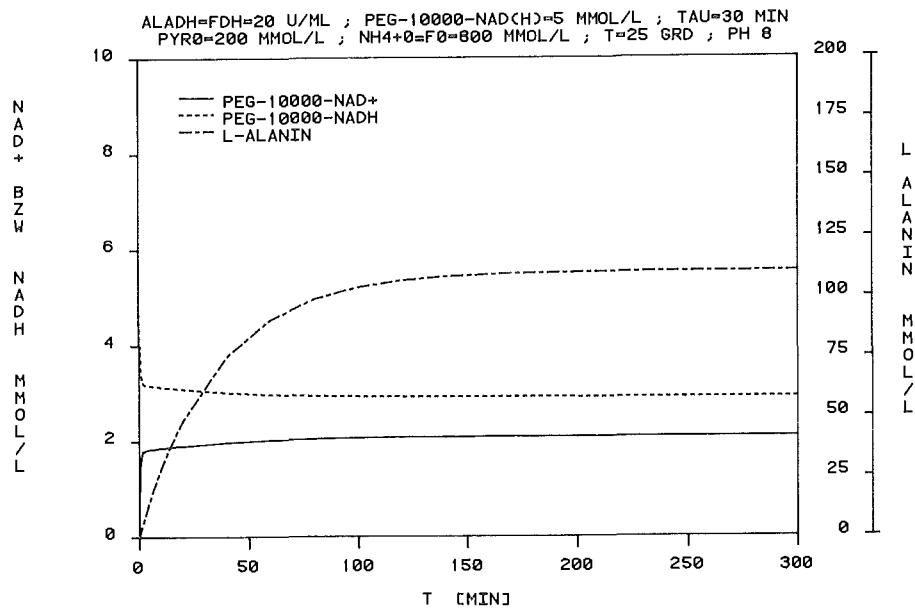


Abb. 4.6. und Abb. 4.7.: Anfahrvorgang eines EMR zur Produktion von L-Alanin mit dem FDH-ALADH System, Coenzym und Produkt-Konzentration als Funktion der Zeit.

Zu Beginn des Versuchs liegt alles Coenzym in der reduzierten Form vor, daher setzt die FDH-Reaktion erst nach Produktionsbeginn von L-Alanin ein. Die ersten 10 Sekunden lang ist L-Alanin und PEG-10 OOO-NAD⁺ fast äquimolar im Reaktor vorhanden.

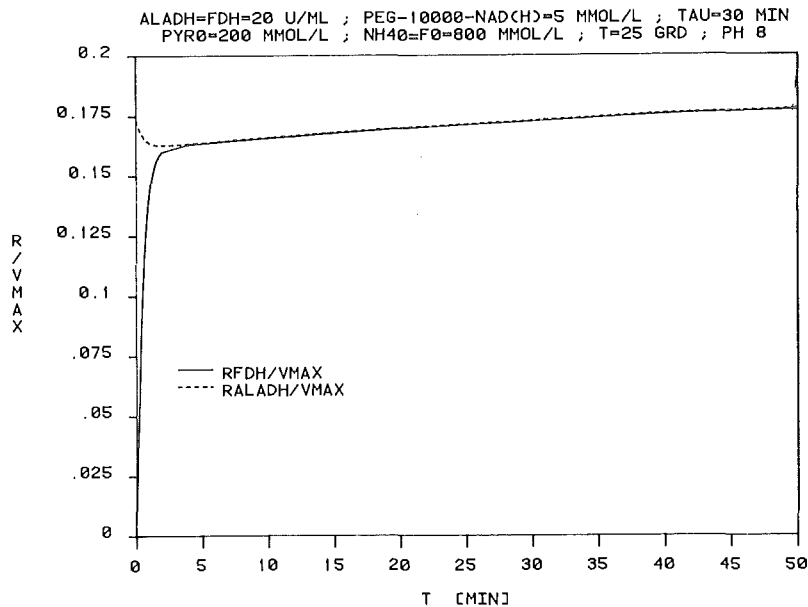


Abb. 4.8.: Anfahrvorgang eines EMR zur Produktion von L-Alanin mit dem FDH-ALADH System, dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit für FDH und ALADH als Funktion der Zeit.

Innerhalb von zwei Minuten stellt sich das Gleichgewicht der Konzentration des PEG-10 OOO-NAD⁺ und -NADH ein, d.h. R_{ALADH} wird gleich R_{FDH} , wie in Abb. 4.8. zu sehen ist. Da ALADH durch einen Überschuß des Pyruvats inhibiert wird, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit noch an, bis der Reaktor den stationären Zustand erreicht hat. Würde man die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Pyruvat-Konzentration darstellen, so wäre diese Funktion ein Ausschnitt von Abb. 4.3.. Erhöht man die Verweilzeit soweit, daß ein Umsatz von über 72,5 % erreicht wird, so sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder. Das Verhältnis der Konzentrationen der reduzierten zur oxidierten Form des Coenzym ändert sich ebenfalls (siehe Abb. 4.9. und Abb. 4.10.).

Abb. 4.9.

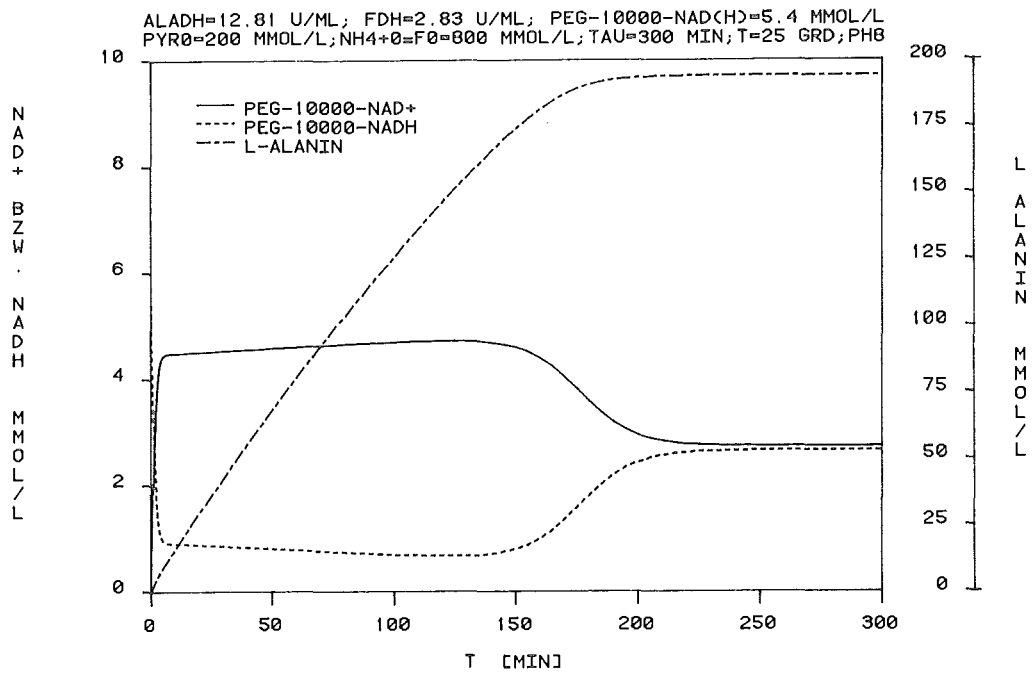


Abb. 4.10.

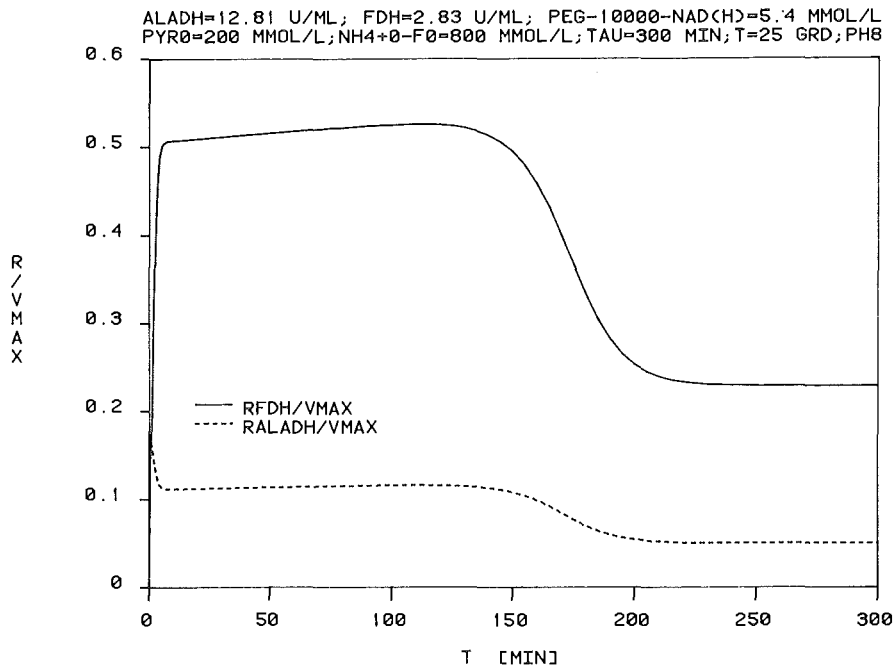


Abb. 4.9. und Abb. 4.10.: Anfahrvorgang eines EMR zur Produktion von L-Alanin mit dem FDH-ALADH System, Coenzym und Produkt-Konzentration als Funktion der Zeit bzw. dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit für FDH und ALADH als Funktion der Zeit.

Bei einem Versuch zur L-Alanin-Produktion im EMR sollte ein Überschuß an ALADH Aktivität verwendet werden und die Verweilzeit sollte so eingestellt werden, daß ein Umsatz von 60 - 80 % erreicht wird, um die Enzymaktivitäten optimal zu nutzen.

4.2. FDH - LEUDH System

In Abb. 4.11. sind die Arbeitspunkte für den stationären Zustand eines EMR zur kontinuierlichen Produktion von L-Leucin dargestellt. Es ist die dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der α -Keto Isocaproat-Konzentration, dem limitierenden Substrat, aufgetragen.

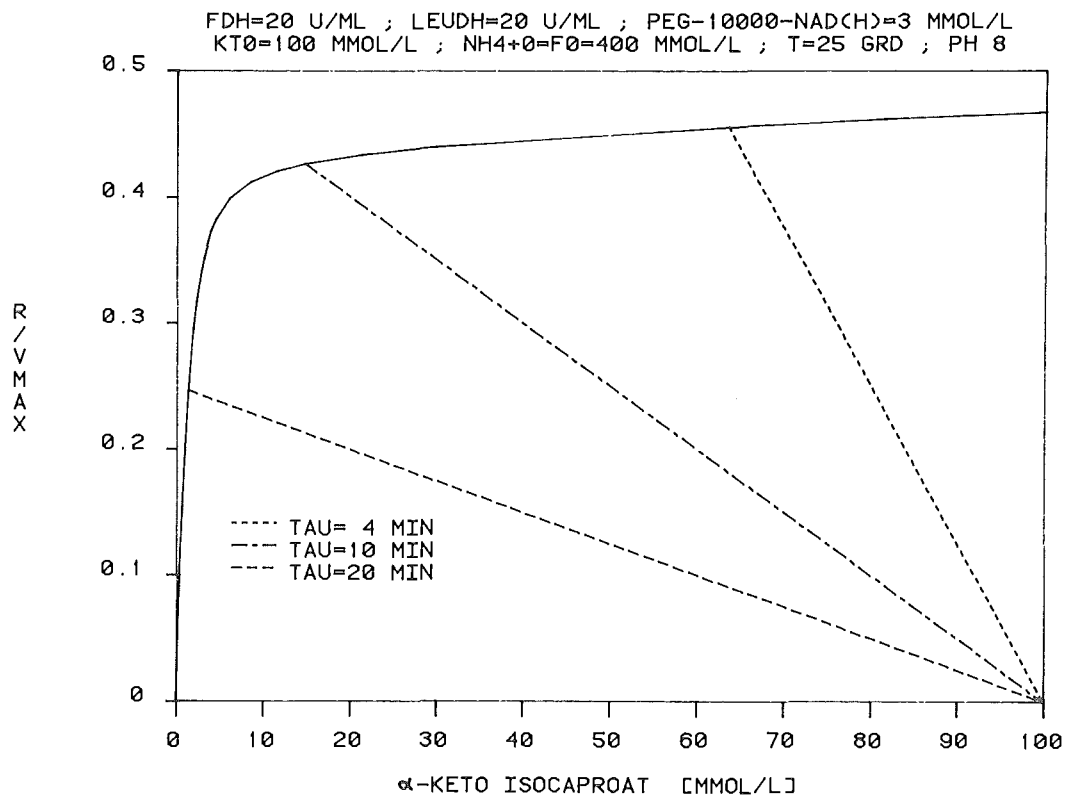


Abb. 4.11.: Dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit für das FDH-LEUDH System als Funktion der α -Keto Isocaproat-Konzentration.

Für einige charakteristische Verweilzeiten sind die Konvektionsgeraden eingezeichnet. Als Bezugsgröße für die Reaktionsgeschwindigkeit wurde der V_{\max} -Wert für LEUDH gewählt, der sich aus dem Produkt von k_{\max} und der NH_4^+ -Konzentration ergibt. Wie beim FDH-ALADH System wurden jeweils 20 U/ml als Enzym-Konzentration verwendet. Da der K_m -Wert der LEUDH bezüglich PEG-10 000-NADH nur 0,0144 mmol/l und der K_m -Wert für FDH bezüglich PEG-10 000-NAD⁺ 0,333 mmol/l beträgt, wird bei einer Coenzym-Konzentration von 3 mmol/l die Enzymaktivität in Bezug auf den Coenzymeinfluß zu 99,5 % bzw. 90 % genutzt.

Die Löslichkeitsgrenze für das Produkt L-Leucin liegt bei 25 °C (in Abhängigkeit vom pH-Wert und Zusammensetzung der Lösung) bei ca. 150 mmol/l. Daher wurde für die Rechnung zunächst eine Substratkonzentration von 100 mmol/l eingesetzt. Für die Ammoniumformiat-Konzentration wurde ein 4-facher Überschuß (400 mmol/l) gewählt, da bei dieser Konzentration einerseits eine weitgehende Substratsättigung der FDH erreicht wird und andererseits der Gehalt an Ammoniumformiat auf einem für die Produktisolierung vertretbaren Niveau gehalten wird.

Da die Substratüberschußinhibierung der LEUDH durch α -Keto Isocaproat wesentlich geringer ist, als dies bei ALADH bezüglich Pyruvat der Fall ist, wird kein Ansteigen der Reaktionsgeschwindigkeit bei steigendem Umsatz mehr erreicht. Bei einer Verweilzeit von 10 min wird ein Umsatz von 85,3 % erreicht, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit mehr als 90 % der Reaktionsgeschwindigkeit beträgt, die maximal unter diesen Randbedingungen erreicht werden kann. Erst bei einem Umsatz von über 95 % sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit stark ab. Wie beim FDH-ALADH System wird auch beim FDH-LEUDH der höchste Umsatz nicht beim Vorliegen gleicher Enzymaktivitäten erreicht, jedoch ist hier nur eine geringfügig höhere Aktivität an FDH als LEUDH nötig, um den maximalen Umsatz zu erreichen, wie man in Abb. 4.12. sehen kann.

Bei einem "Enzym-Molenbruch" an FDH von 0,55 wird der maximale Umsatz erreicht, wobei der Molenbruch an PEG-10 000-NADH nur 0,1 beträgt. Die Lage des Optimums ergibt sich dadurch, daß FDH durch NADH stark, während LEUDH durch NAD^+ nur gering inhibiert wird. Da der K_m -Wert der LEUDH für PEG-10 000-NADH noch über eine Größenordnung kleiner ist als bei ALADH, wird bei niedriger NADH Konzentration die Aktivität der LEUDH besser genutzt als bei ALADH, so daß ein höherer Anteil an FDH verwendet werden kann.

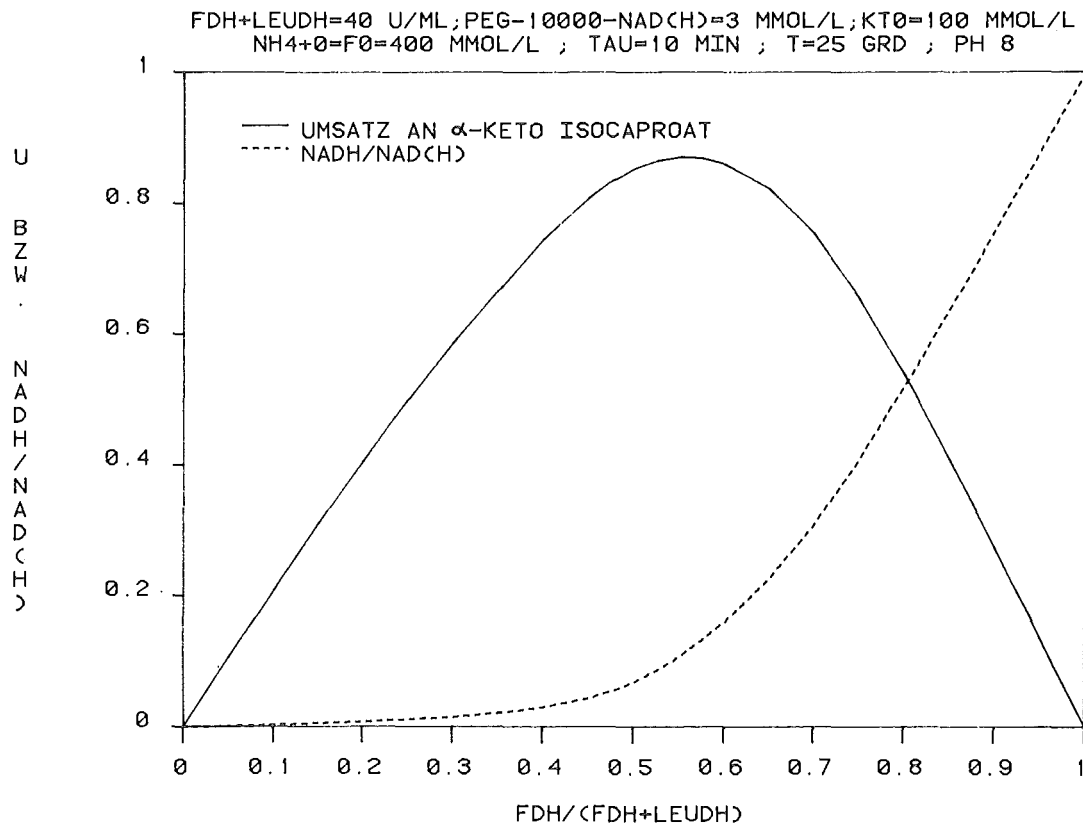


Abb. 4.12.: Umsatz und Molenbruch an PEG-10 000-NADH für das FDH-LEUDH System als Funktion des "Molenbruchs" der FDH Aktivität.

In Abb. 4.13. ist der Einfluß des "Enzym-Molenbruchs" der FDH auf die dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms aufgetragen. Bei einem Unterschuß an FDH steigt die Aktivität der FDH nur noch geringfügig an, da das Coenzym ohnehin schon überwiegend in der oxidierten Form vorliegt (vergleiche Abb. 4.12.) und ein hoher Formiatüberschuß verwendet wird.

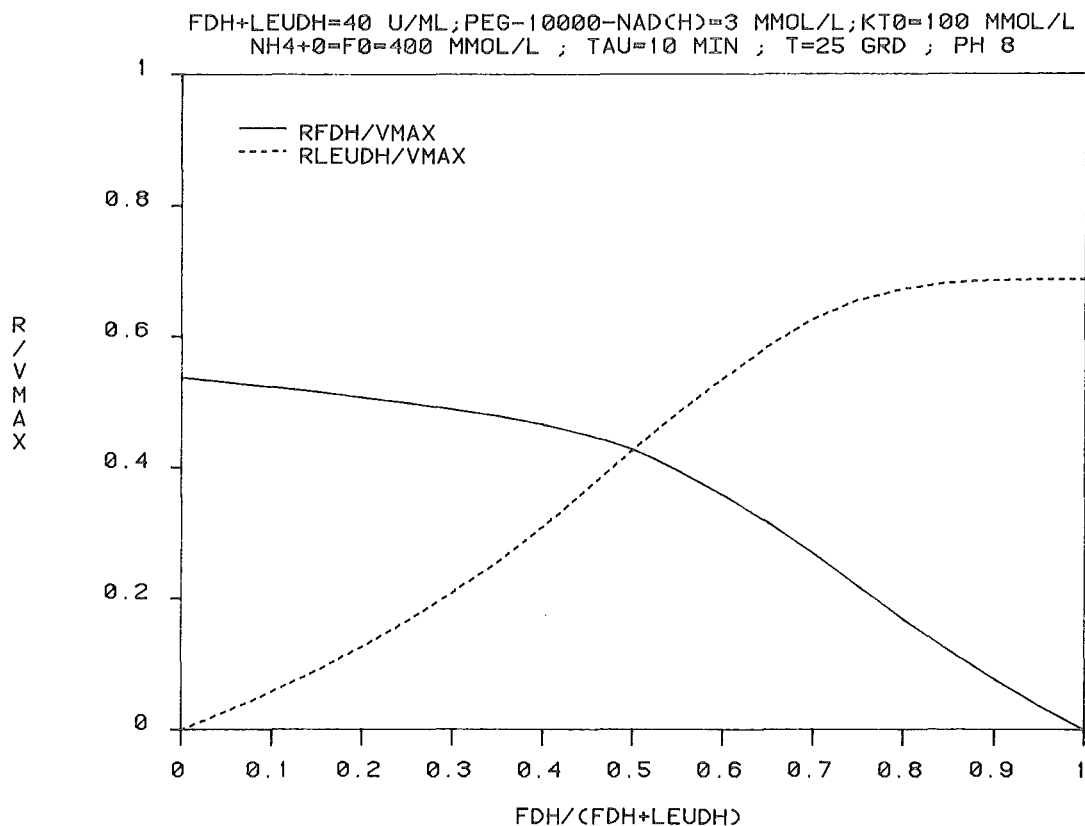


Abb. 4.13.: Dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit von FDH und LEUDH für das FDH-LEUDH System als Funktion des "Molenbruchs" der FDH Aktivität.

Bei einem Überschuß an FDH nimmt die Aktivität der LEUDH zunächst noch zu, flacht jedoch mit weiter zunehmendem Überschuß an FDH ab, da zwar einerseits unter diesen Bedingungen die PEG-10 000-NADH-Konzentration zunimmt, aber andererseits der Umsatz zurückgeht, was durch die Substratüberschußinhibition dämpfend auf den Anstieg der LEUDH Aktivität wirkt.

Beim Anfahren eines EMR liegen bezüglich der Einstellung eines stationären Wertes für die Konzentrationen an reduziertem und oxidiertem Coenzym die Verhältnisse ähnlich wie beim FDH-ALADH System. Durch die geringere Verweilzeit (hier $\tau = 10$ min) wird jedoch bereits nach 0,5 min ein stationärer Wert für die Coenzym-Konzentrationen (siehe Abb. 4.14.) und bezüglich einer Angleichung der Reaktionsgeschwindigkeit für FDH und LEUDH erreicht (siehe Abb. 4.16.). Ein stationärer Wert für die Sub-

strat- und Produkt-Konzentration stellt sich erst nach mehreren Verweilzeiten ein (siehe Abb. 4.15.).

Abb. 4.14.

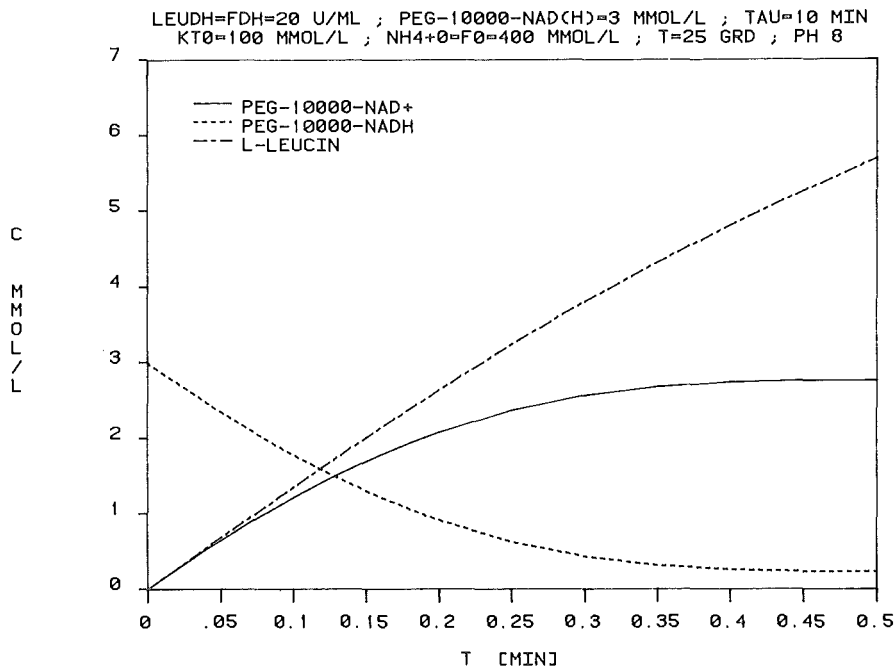


Abb. 4.15.

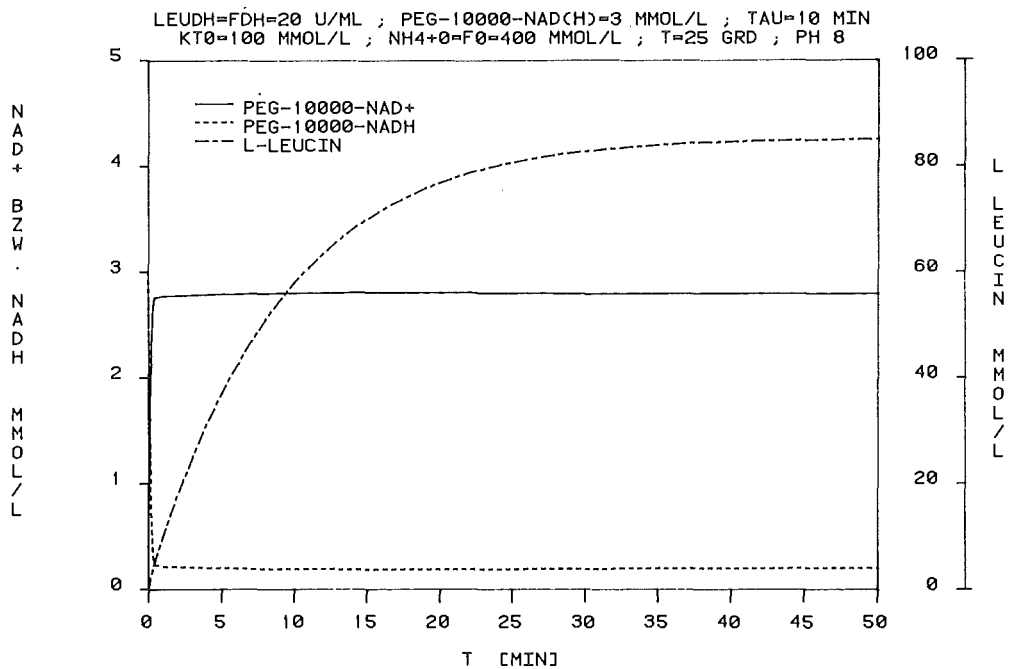


Abb. 4.14, und Abb. 4.15.: Anfahrvorgang eines EMR zur Produktion von L-Leucin mit dem FDH-LEUDH System, Coenzym und Produkt-Konzentration als Funktion der Zeit.

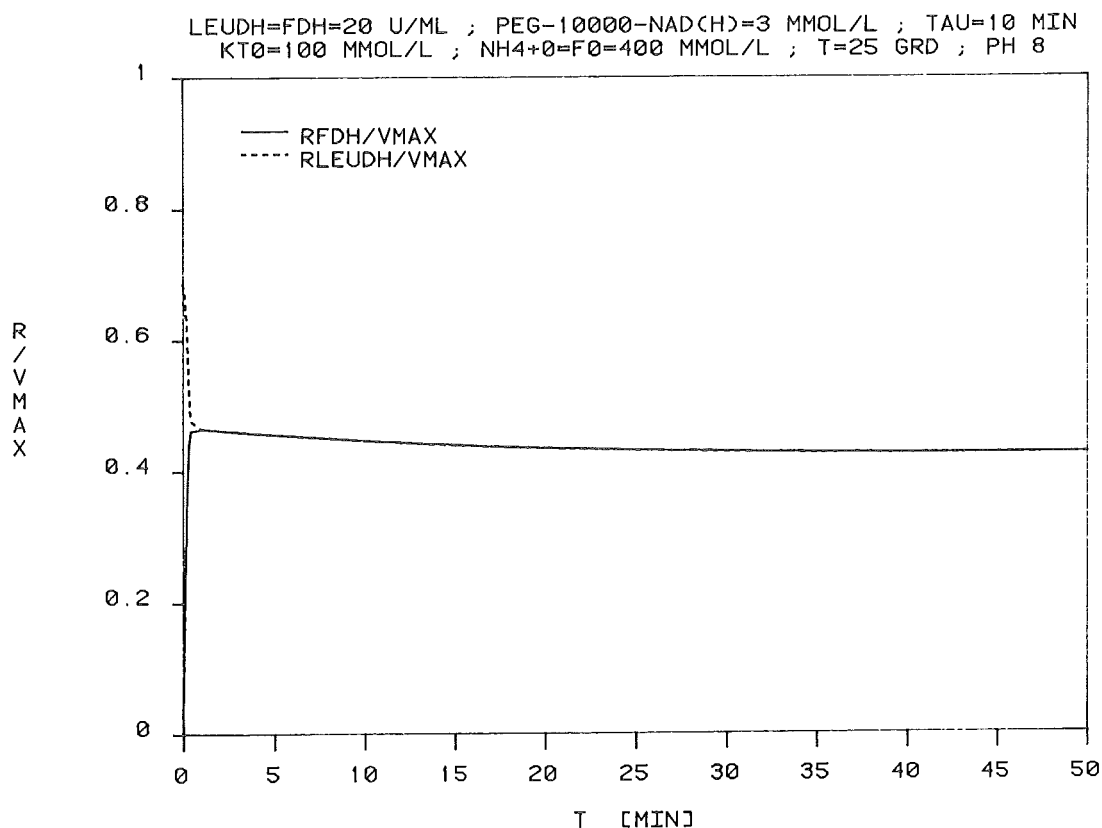


Abb. 4.16.: Anfahrvorgang eines EMR zur Produktion von L-Leucin mit dem FDH-LEUDH System, dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit für FDH und LEUDH als Funktion der Zeit.

Die Reaktionsgeschwindigkeit für FDH und LEUDH fällt bis zum Erreichen des stationären Zustandes noch gering ab, wie in Abb. 4.16. dargestellt. Würde man die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der α -Keto Isocaproat-Konzentration darstellen, so wäre diese Funktion ein Ausschnitt von Abb. 4.11..

Bei einem Versuch zur L-Leucin-Produktion im EMR sollte ein geringer Überschuß an FDH Aktivität verwendet werden und die Verweilzeit sollte so eingestellt werden, daß ein Umsatz von 80 - 95 % erreicht wird, um die Enzymaktivitäten optimal zu nutzen. Eine Coenzym-Konzentration von 3 mmol/l sollte ausreichend sein.

5. Experimentelle reaktionstechnische Untersuchungen

Durch numerische Lösung der Massenbilanzen läßt sich, wie oben beschrieben, die Produktionsleistung des EMR theoretisch berechnen. Die experimentelle Basis dieser Berechnungen stellen die Daten aus den enzymkinetischen Messungen dar. Vorausgesetzt wurde bei diesen Berechnungen, daß die Enzyme und das Coenzym völlig stabil sind. Dieses ist jedoch nicht der Fall. Je nach den Reaktionsbedingungen (z.B. Temperatur, pH, Redoxpotential und Ionenstärke) desaktivieren Enzyme und Coenzyme mehr oder weniger stark. Der Einfluß der Temperatur und des pH deutete sich schon bei den kinetischen Versuchen an.

Außer diesen mediumabhängigen Faktoren, die durch die Lagerung der Enzyme und Coenzyme in einem entsprechenden Medium untersucht werden können, spielen auch reaktorabhängige Faktoren eine Rolle. Die Desaktivierung im EMR kann teilweise durch eine mechanische Beanspruchung der makromolekularen Enzyme durch Scherkräfte verursacht werden. Durch mangelnde Retention der UF-Membran kann Aktivität an Enzym oder Coenzym im kontinuierlichen Betrieb verloren gehen. Schließlich kann durch die Konzentrationspolarisation vor der Membran die Sättigungskonzentration des Proteins erreicht werden, so daß ein Teil des Katalysators nur noch mit geringerer Effektivität in nicht mehr homogener Katalyse wirkt.

5.1. Lagerstabilität der Enzyme und Coenzyme

Die in dieser Arbeit verwendete Formiat Dehydrogenase wurde bei -10°C in einer Lösung aufbewahrt, die 50 mmol/l Phosphatpuffer (pH 7,5), 0,1 % 2-Mercaptoethanol, 50 % Glycerin enthielt. Das 2-Mercaptoethanol diente als Desoxidans, das Glycerin als Frostschutzmittel. Unter diesen Lagerbedingungen war über mehrere Monate keine Abnahme der Aktivität des Enzyms zu beobachten.

ALADH wurde bei + 4 °C als Suspension aufbewahrt in einer Lösung, die 3,2 mol/l Ammoniumsulfat enthielt. Unter diesen Lagerbedingungen war über mehrere Monate keine signifikante Abnahme der Aktivität des Enzyms zu beobachten.

Die LEUDH wurde bei + 4 °C in einer Lösung aufbewahrt, die 10 mmol/l Phosphatpuffer (pH 7,8) und 0,1 % 2-Mercaptoethanol enthielt. Unter diesen Lagerbedingungen war ein Aktivitätsverlust von 6 % pro Monat festzustellen.

Das Coenzym wurde als PEG-10 OOO-NADH aus einer 3 - 6 millimolaren Lösung bei - 20 °C eingefroren und aufbewahrt. Unter diesen Lagerbedingungen war über mehrere Monate kein signifikanter Abfall der coenzymatischen Aktivität zu beobachten. Bei allen Versuchen mit PEG-10 OOO-NAD(H) wurde jeweils die enzymatische aktive Konzentration angegeben. Die Bindung von NAD(H) an ein Polymer steigert die Stabilität des NAD(H) beträchtlich. Hierbei scheint PEG als Polymer besonders geeignet zu sein (19).

Neben der Untersuchung der Lagerstabilität der Enzyme und Coenzyme bei tiefer Temperatur und in konzentrierter Lösung wurde auch die Lagerstabilität unter Bedingungen, wie sie bei den EMR-Versuchen herrschten, untersucht, d. h. in verdünnter Lösung in Gegenwart von Substrat und Produkt bei Reaktionstemperatur. Die Ergebnisse sind in Tab. 5.1. zusammengefaßt.

Lagerbedingungen	Temp. (°C)	Zeit (Tage)	k _{des} (1/d)
FDH verd. mit 150 $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ Formiat	40	2,7	0,0075
FDH verd. mit 150 $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ Formiat	25	5,5	0,0074
ALADH verd. mit 50 $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ Phosphat- Puffer	40	3,0	0,0067
LEUDH verd. mit 50 $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ Phosphat- Puffer	25	23.0	0,0215

Tab. 5.1.: Lagerstabilität der Enzyme.

5.2. Stabilität der Einzel-Enzym-Systeme im Membran-Reaktor

Die Stabilität der Einzel-Enzym-Systeme unter Betriebsbedingungen, wie sie in einem UF-Membran-Reaktor vorliegen, wurde durch kontinuierliche Versuche unter Verwendung von nativem NAD^+ für FDH und nativem NADH für ALADH untersucht. Bei diesen Versuchen wurde nur das Enzym durch die UF-Membran im Reaktor zurückgehalten, wogegen das Coenzym kontinuierlich zu- und abgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen ist es nur möglich, dem Coenzym äquimolare Mengen an Formiat bzw. Pyruvat umzusetzen. Die Bauweise des Membran-Reaktors, wie er bei diesen und den folgenden Versuchen zur kontinuierlichen Reaktionsführung mit Coenzymregenerierung verwendet wurde, ist in Abb. 5.1. dargestellt.

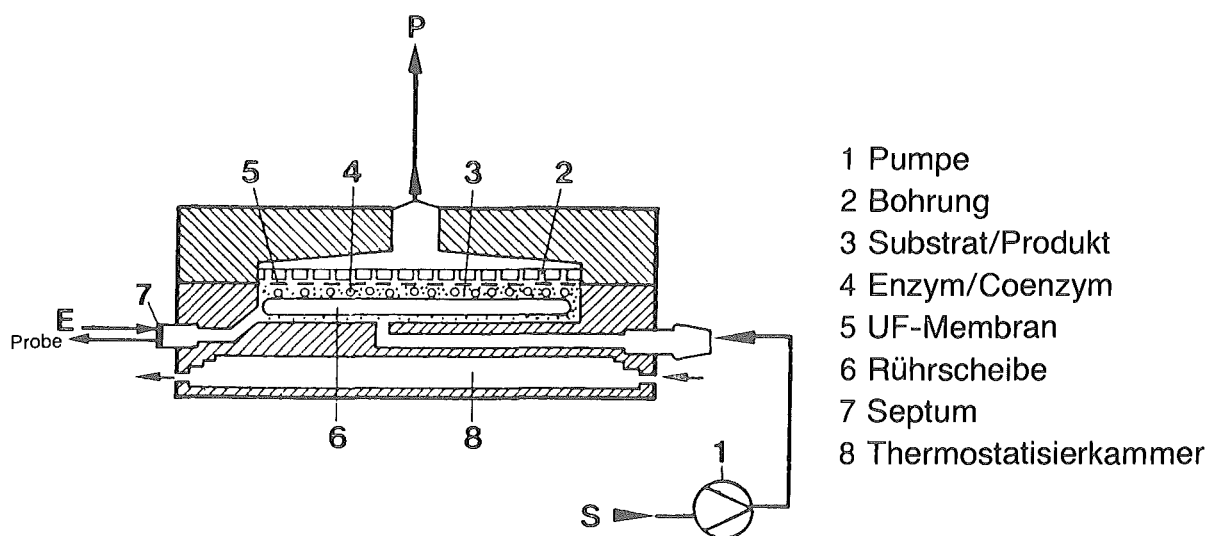


Abb. 5.1.: Enzym Membran Reaktor

Die UF-Membran wird von unten nach oben mit Reaktionslösung durchströmt und direkt unterhalb der Membran mit einem Magnetrührer gerührt, um die Gel- und Konzentrationspolarisation vor der Membran möglichst gering zu halten. Im unteren Teil des Reaktors befindet sich eine Thermoisolierungskammer, um eine konstante Reaktortemperatur zu gewährleisten. Mit dem Reaktionsraum ist neben dem Einlaß für die Substratlösung noch eine weitere Öffnung verbunden, die - mit einem Septum verschlossen -

es ermöglichen soll, dem Reaktor eine Probe mit einer Spritze zu entnehmen oder Enzym direkt in den Reaktor einspritzen zu können.

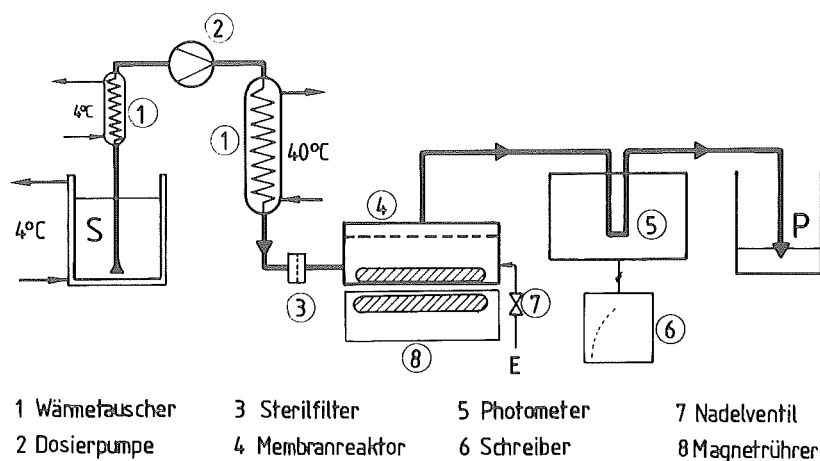


Abb. 5.2. Enzym Membran Reaktor-(EMR)-Experiment

In Abb. 5.2. ist die EMR-Versuchsapparatur dargestellt, die für die kontinuierliche Reaktionsführung mit Einzel-Enzym- und Multi-Enzym-Systemen verwendet wurde.

Bei den Versuchen mit FDH (22) und ALADH (50) wurde wie folgt vorgegangen:

Nach dem blasenfreien Einsetzen der UF-Membran wurde der Reaktor mit Wasser vollständig gefüllt. Für den Versuch mit FDH wurde eine UF-Membran vom Typ PM10 der Fa. Amicon (Witten/Ruhr) mit einer Ausschlußgrenze von 10 000 g/mol verwendet. Für den Versuch mit ALADH wurde eine UF-Membran vom Typ XM50 der Fa. Amicon mit einer Ausschlußgrenze von 50 000 g/mol eingesetzt. Die Auswahl der UF-Membran richtete sich unter anderem nach dem Molekulargewicht von FDH (74 000 g/mol) und ALADH (228 000 g/mol), um möglichst wenig Enzym durch mangelnde Retention der UF-Membran zu verlieren, aber trotzdem gute Permeabilität für die Produktlösung zu erreichen. Das im Reaktor befindliche Wasser wurde anschließend durch Substratlösung ersetzt, indem etwa 100 ml durch den Reaktor gepumpt wurden. Um möglichst auch kleinste Schmutzpartikel und eventuell in die Substratlösung gelangte Mikroorganismen aus

dem Substratstrom zurückzuhalten, ließ man die Substratlösung einen Sterilfilter passieren, bevor sie dem Reaktor zugeführt wurde. Es wurde während des Versuchs zwar nicht streng steril gearbeitet, aber wie in einem Test durch Tüpfeln von Reaktorinhalt auf einen Nährboden für Mikroorganismen festgestellt wurde, trat kein mikrobieller Befall des Reaktors auf.

Zum Start des Versuchs wurde das Enzym mit einer Spritze direkt in den Reaktor eingespritzt, um einen definierten Versuchsbeginn zu haben. Der Verlauf der Reaktion wurde durch photometrische Messung der NADH-Konzentration verfolgt. Die Substratlösung wurde in einem auf 4 °C gekühlten abgedunkelten Gefäß aufbewahrt, um einen thermischen und durch Lichteinwirkung bedingten Zerfall der Substrate zu verhindern. Als Pumpe für die Substratlösung wurde eine Wechselkolbenpumpe (Firma Reichelt, Heidelberg) verwendet. Diese Pumpe arbeitet nach dem Prinzip einer Spritze, wobei dadurch, daß gleichzeitig ein Kolben entleert und ein anderer gefüllt wird, sowie eine automatische Ventilsteuerung vorhanden ist, der Volumenstrom (Bereich: 2 - 80 ml/h) sehr konstant eingehalten werden kann. Durch einen konstanten Volumenstrom konnte die Verweilzeit im Reaktor konstant gehalten werden.

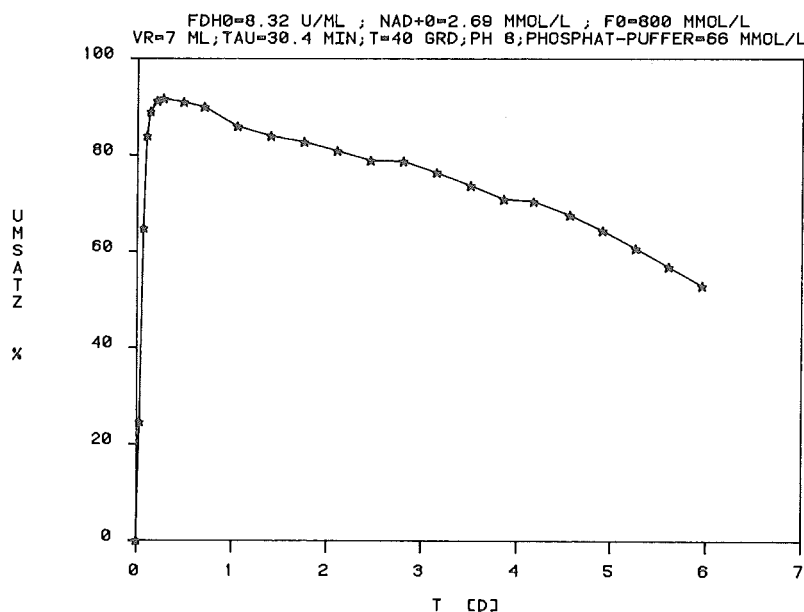


Abb. 5.3.: Dauerversuch mit FDH im EMR

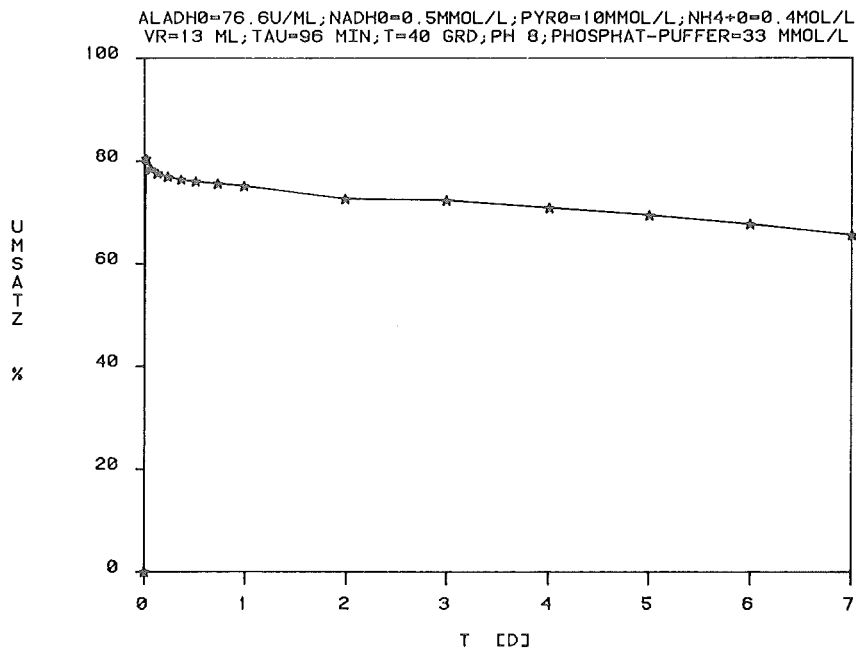


Abb. 5.4.: Dauerversuch mit ALADH im EMR

Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 5.3. für FDH und Abb. 5.4. für ALADH dargestellt.

Durch Lösen der Massenbilanz für das jeweilige Reaktionssystem kann man Informationen erhalten über den Verlust an Enzym zu Beginn des Versuches durch Belegung der UF-Membran, durch Polarisation und über die Desaktivierung des Enzyms während des Versuchs.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{(S_0 - S)}{\tau} - R \cdot E = 0 \quad \text{im stationären Zustand} \quad (5.1.)$$

$$E = \frac{(S_0 - S)}{\tau \cdot R} \quad , \quad (5.2.)$$

für R ist das jeweilige kinetische Modell einzusetzen.

Für den Aktivitätsverlust erhält man:

$$AV = \frac{\ln(E_{t1}/E_{t2})}{(t_2 - t_1)} \cdot (E_{t1} \cdot V_{\max}) \cdot \frac{U}{\text{ml} \cdot d} \quad (5.3.)$$

Für die durchschnittliche Raum-Zeit-Ausbeute an Produkt bezogen auf den Reaktorinhalt erhält man:

$$\eta_{RZ} = \frac{(U_{t1} + U_{t2}) \cdot S_o \cdot M_p}{2 \cdot \tau} \cdot \frac{g}{l \cdot d} \quad (5.4.)$$

M_p : Molekulargewicht des Produkts.

Der Enzymverbrauch während des Versuchs ergibt sich wie folgt:

$$EV = \frac{AV}{\eta_{RZ}} \cdot \frac{U\text{-Enzym}}{g \text{ Produkt}} \quad (5.5.)$$

In Tab. 5.2. sind die Parameter und Ergebnisse der Versuche mit FDH und ALADH im Einsatz jeweils als Einzel-Enzym-Systeme im EMR zusammengefaßt.

		FDH (22)	ALADH (50)
U_{max}	%	92	80,4
U_{Ende}	%	53	65,5
t_{maxU}	d	0,292	0,0218
T_{Ende}	d	6,292	7
E_{maxU}	mg · l ⁻¹	1710	0,0224
E_{Ende}	mg · l ⁻¹	120	0,0114
AV	U/(ml · d)	0,94	0,00216
η_{RZ}	g/(l · d)	62	3,6
EV	U/(g Produkt)	15	0,60
τ	min	30,4	96
T	°C	40	40
k_{des}	1/d	0,443	0,097

Tab. 5.2.: Ergebnisse der Dauerversuche mit FDH bzw. ALADH im EMR.

Der Verlust an Enzym zu Anfang des Versuchs ist beträchtlich. Dieser Verlust dürfte durch ein Belegen der UF-Membran mit einer Gelschicht aus Enzym verursacht sein. Der prozentuale Verlust dafür ist bei ALADH wesentlich höher als bei FDH, da für die gleiche Aktivität eine wesentlich geringere Proteinmenge an ALADH als an FDH nötig ist. Die Enzymdesaktivierung während des Versuchs ist wesentlich höher als bei der Lagerung. Für FDH muß - zumal bei der kurzen Verweilzeit - ein erheblicher Retentionsverlust vermutet werden. In den folgenden Versuchen wurde jeweils eine UF-Membran mit kleinen Poren verwendet.

Neben der Untersuchung der Stabilität von Enzymen im EMR ohne Coenzymregenerierung wurde das für den Einsatz zur kontinuierlichen Produktion von L-Aminosäure im EMR verwendete PEG-10 000-NADH bezüglich seiner Stabilität im EMR in Abwesenheit von Enzymen untersucht. Es wurde hierbei der EMR mit einer YM5 UF-Membran ausgestattet (Fa. Amicon, Witten). Der Reaktor wurde über 5 Stunden mit 70 %-iger wässriger Ethanol-Lösung sterilisiert, wobei der Flüssigkeitsstrom vor dem Reaktoreinlaß einen Sterilfilter passierte. Die Ethanol-Lösung wurde durch Wasser verdrängt und dieses wiederum durch eine Lösung, wie sie als Produktlösung eines EMR-Experiments mit Coenzymregenerierung entsteht (vgl. 5.3.1.). Diese Lösung enthielt 100 mmol/l L-Leucin, 100 mmol/l NaHCO_3 , 300 mmol/l NH_4 -Formiat und 50 mmol/l Kaliumphosphat. Die Lösung war auf pH 8 eingestellt. Durch die Thermostatisiereinrichtung wurde die Temperatur im Reaktor auf 25 °C eingestellt. Zu Versuchsbeginn wurden 10 ml (ein Reaktorvolumen) einer Lösung von PEG-10 000-NADH (51,6 µmol coenzymatisch aktiv) über ein Septum vor dem Sterilfilter dem Flüssigkeitsstrom zugeführt. Es wurde nun über 33 Tage die oben beschriebene "Produktlösung" mit 2,5 ml/h durch den Reaktor gepumpt.

Durch Entnahme einer Probe von 10 μ l wurde im Laufe der Zeit die im Reaktor vorhandene Konzentration an Coenzym mit Hilfe eines enzymatischen Tests mit LEUDH beobachtet. Zum Vergleich wurde die verwendete reine Coenzym-Lösung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und in gleicher Weise untersucht. Es wurde jeweils der coenzymatisch aktive Gehalt bestimmt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 5.5. dargestellt.

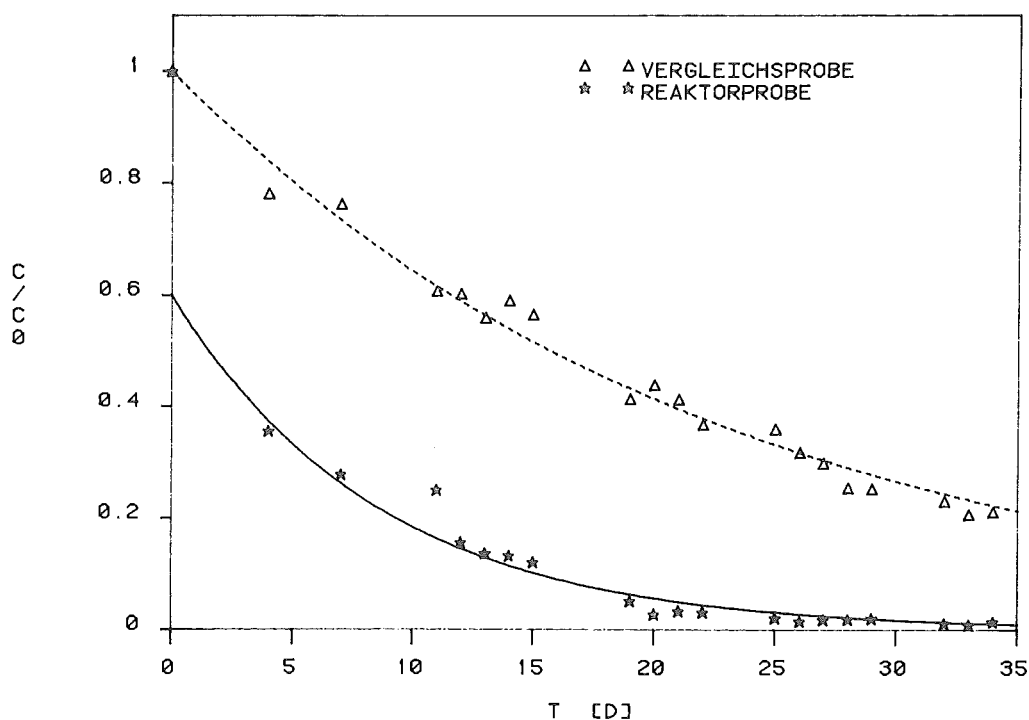


Abb. 5.5.: Untersuchung der Langzeitstabilität von PEG-10 OOO-NADH im UF-Membran-Reaktor.

Innerhalb der ersten drei Tage geht ein erheblicher Anteil an Coenzym durch Belegen der Membran und durch Ausspülen niedermolekularer Anteile verloren. Anschließend jedoch verläuft der Verlust an Coenzym in einer konstanten Rate. Die Desaktivierung des Coenzym in wässriger Lösung bei pH 8 und 4 °C ist die bei pH 8 und der vorliegenden Konzentration des Coenzym minimale Desaktivierung.

Die Desaktivierung des Coenzym lässt sich als Reaktion erster Ordnung beschreiben. Die Geschwindigkeitskonstante ist die Desaktivierungskonstante. Die Desaktivierung des Coenzym im

UF-Membran-Reaktor setzt sich aus den folgenden Anteilen zusammen:

- "Grunddesaktivierung": Die Desaktivierung, die bei der Lagerung des Coenzym in substrat- und produkt-freier Lösung bei tiefer Temperatur auftritt.
- "Elutionsverlust": Scheinbare Desaktivierung durch Ausspülen des Coenzym durch die UF-Membran wegen zu geringer Retention.
- "Reaktordesaktivierung": Erhöhung der Grunddesaktivierung durch den Einfluß der Substrate und sonstiger Einflüsse, die nicht als Elutionsverlust erklärbar sind.

Zur Messung der Grunddesaktivierung wurde die Desaktivierung der CoenzymLösung untersucht, als reine wässrige Lösung (pH 8) bei einer Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C.

Die Retention einer PEG-10 000-NADH-analogen Verbindung durch die verwendete UF-Membran beträgt $R=0.993$ (51). Die verwendete PEG-10 000-NADH-analoge Verbindung enthält statt NADH einen stabilen Farbstoff kovalent gebunden.

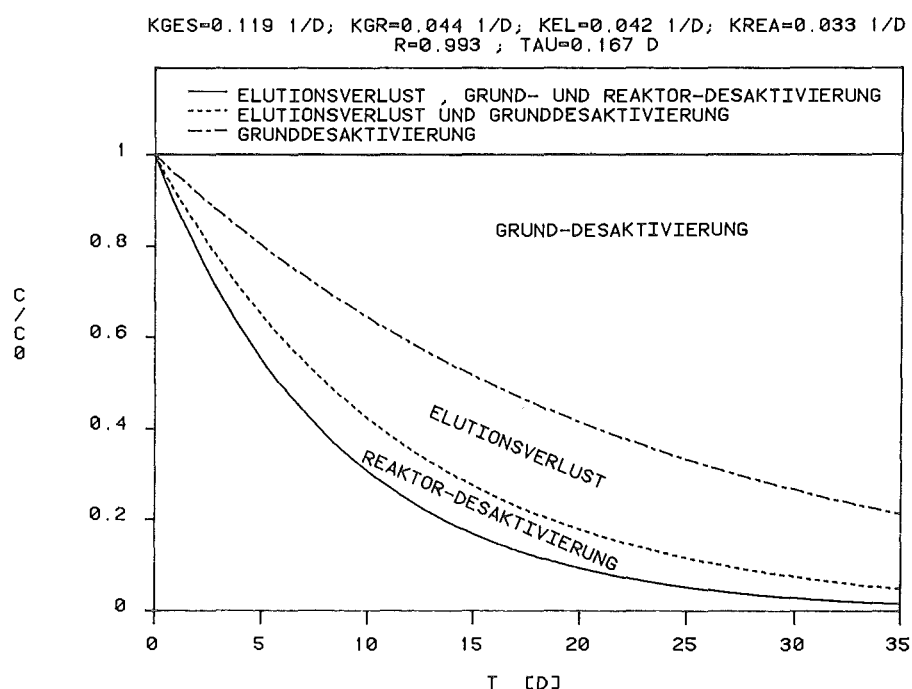


Abb. 5.6.: Desaktivierung von PEG-10 000-NADH im UF-Membran-Reaktor

In Abb. 5.6. ist der Einfluß der verschiedenen Anteile der Desaktivierung von PEG-10 OOO-NADH dargestellt. Es wird angenommen, daß sich die "Gesamt-Desaktivierungskonstante" k_{ges} additiv aus der "Grund-Desaktivierungskonstante" k_{gr} , der "Elutionsverlust-Konstante" $k_{el} = (1-R)/\tau$ und der "Reaktor-Desaktivierungskonstante" k_{rea} zusammensetzt:

$$k_{ges} = k_{gr} + k_{el} + k_{rea} \quad (5.6.)$$

Der Verlust an Coenzym durch Elution beträgt bei einer Verweilzeit von 4 Stunden ca. 35 % des Gesamtverlusts. In einem EMR-Experiment wird die Retention des Coenzym durch die Bildung einer Gelschicht aus Enzymprotein auf der UF-Membran noch verbessert (siehe Kapitel 5.3.2.) Die Grund- und Reaktordesaktivierung dürfte sich jedoch ebenfalls ändern, da das Coenzym sowohl in der reduzierten als auch in der oxidierten Form vorliegt und die Enzyme nicht nur durch Verbesserung der Retention des Coenzym den Coenzymverlust beeinflussen. Aus der vorgestellten Untersuchung über die Coenzymdesaktivierung erhält man jedoch eine Vorstellung über die Größenordnung der den Verlust an Coenzym beeinflussenden Faktoren.

5.3. Kontinuierliche enzymatische L-Aminosäure-Produktion mit Coenzymregenerierung

5.3.1. Reaktionsführung ohne Nachdosierung von Enzymen bzw. Coenzym

Nachdem die Katalysatorstabilitäten im EMR untersucht, mit Hilfe kinetischer Messungen Modelle für die Kinetik der Enzyme aufgestellt und aus diesen theoretisch günstige Betriebsbedingungen ermittelt worden waren, sollte in Langzeitversuchen die Produktion von L-Alanin und L-Leucin im EMR mit Coenzymregenerierung untersucht werden.

Das Fließbild und ein Foto der hierzu verwendeten Versuchsanlage ist in Abb. 5.7. und Abb. 5.8 dargestellt.

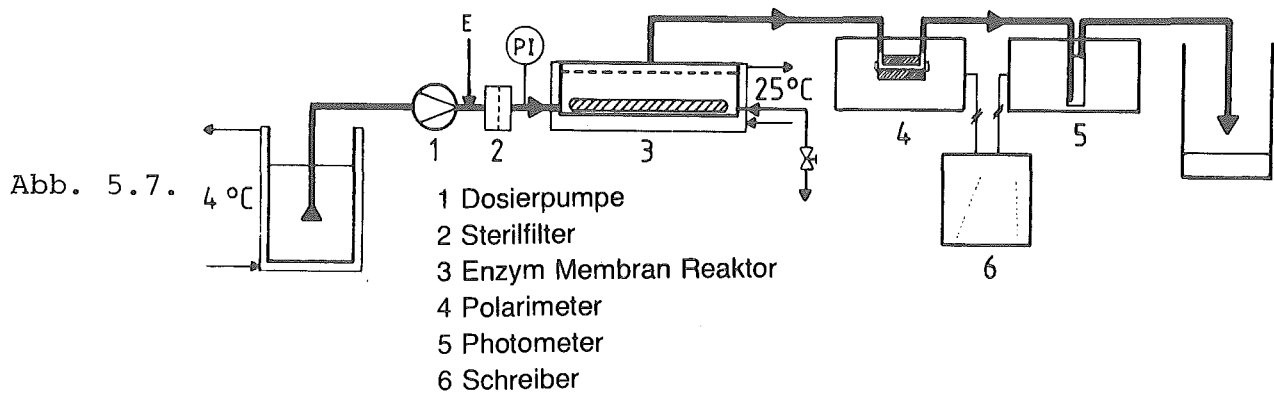


Abb. 5.8.



Abb. 5.7. und 5.8.: Enzym Membran Reaktor zur kontinuierlichen Reaktionsführung mit Coenzymregenerierung.

Die Substratlösung wird kontinuierlich durch einen Sterilfilter in den Reaktor gepumpt. Im Reaktor reagieren die Substrate mit dem Coenzym katalysiert durch die Enzyme und Produkt entsteht. Entsprechend dem Substrat-Volumenstrom, der dem Reaktor zugeführt wird, verläßt die Produktlösung den Reaktor durch die Poren der UF-Membran, Enzyme und Coenzym werden hierbei durch die UF-Membran zurückgehalten. Als UF-Membran wurde eine YM5-Membran (Firma Amicon, Witten) verwendet. Die nominelle Ausschlußgrenze bezüglich des Molekulargewichts beträgt 5 000 g/mol. Die Produktlösung wird in einem Photometer und einem automatischen Polarimeter vermessen.

Mit dem Photometer konnte durch Messung bei 340 nm das Ausspülen der niedermolekularen Anteile in PEG-10 000-NAD(H), sowie der Einspülvorgang mit Substrat beobachtet werden. Das Polarimeter diente zur kontinuierlichen Messung der L-Alanin- oder L-Leucin-Konzentration. Wie bei den unter 5.2. beschriebenen Versuchen wurde der EMR auch hier mit einem Magnetrührer gut gerührt, um die Bildung einer Gelschicht möglichst gering zu halten.

Ein piezoresistiver Druckaufnehmer diente zur Überwachung des Drucks im Reaktor bzw. des Differenzdrucks an der UF-Membran, da hinter der UF-Membran kein wesentlicher Überdruck herrschte. Mit Hilfe dieser Messung konnte man den Einspülvorgang der Enzyme und Coenzyme in den Reaktor und die steigende Membranbelegung durch die Polymere überwachen. Weiterhin war es wichtig zu beobachten, daß der maximal zulässige Druck auf die Membran nicht überschritten wurde.

Durch ein Septum konnten Proben aus dem Reaktor entnommen werden. Mit einer Thermostatisierungseinrichtung wurde der Reaktor auf konstanter Reaktionstemperatur gehalten.

Beim Start des Experiments wurde der Reaktor zuerst kontinuierlich mit 70 %-igem wässrigen Ethanol sterilisiert (Verweildauer von 5 Stunden). Darauf wurde der Reaktor zuerst mit Wasser

und dann mit Substrat-Lösung gespült. FDH und PEG-10 000-NADH wurden als wässrige Lösungen zwischen Pumpe und Sterilfilter in den Substratstrom eingespritzt und mit diesem durch den Sterilfilter in den Reaktor gespült. Durch Einspritzen von ALADH bzw. LEUDH in einer Lösung von geringem Volumen in den Substratstrom zwischen Sterilfilter und Pumpe wurde die Reaktion schließlich gestartet.

Der Reaktorinhalt betrug 10 ml, der Substratstrom 2 ml/h und damit die Verweilzeit 5 Stunden. Als Reaktionstemperatur wurde bei den folgenden Experimenten 25 °C gewählt, um eine geringe Desaktivierungsrate für die Enzyme und Coenzyme zu erreichen.

FDH-ALADH System

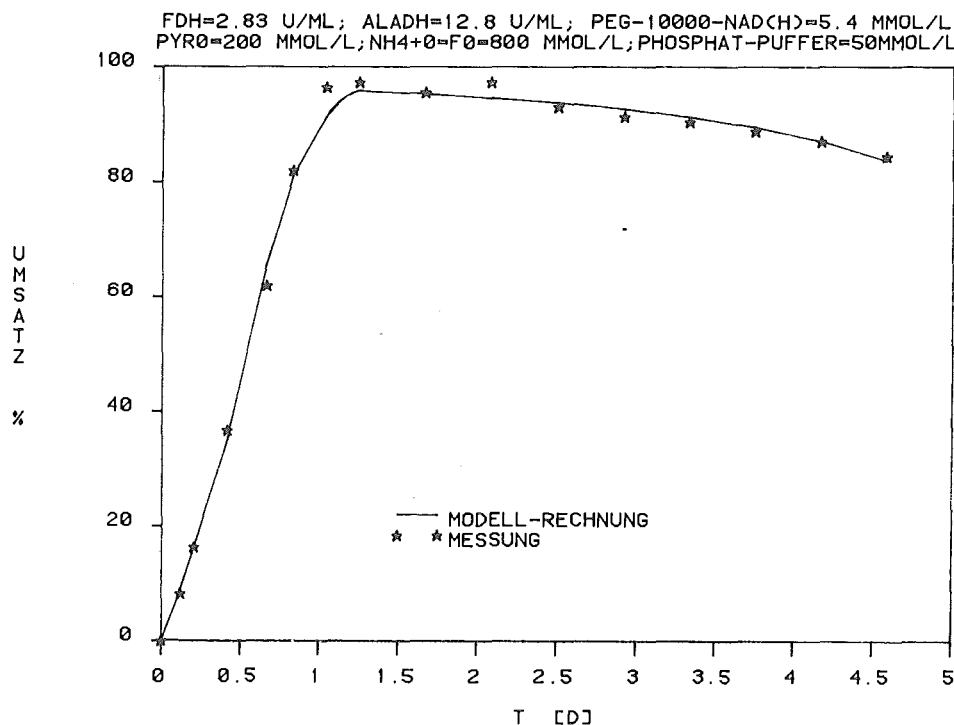


Abb. 5.9.: Kontinuierliche L-Alanin-Produktion im EMR mit Coenzymregenerierung

In Abb. 5.9, ist das Ergebnis eines Experiments zur kontinuierlichen L-Alanin-Produktion aus Natrium-Pyruvat und NH_4 -Formiat unter Verwendung des FDH - ALADH Multi-Enzym Systems dargestellt.

Zu Beginn des Versuchs wurden dem Reaktor FDH, PEG-10 OOO-NADH und schließlich ALADH zugeführt. Innerhalb von 30 Stunden, was 6 Verweilzeiten entsprach, wurden die Enzyme und das Coenzym in den Reaktor eingespült. Da der Sterilfilter die Einspülung der Polymer-Moleküle in den Reaktor etwas verzögerte, wurde der stationäre Zustand im EMR (der sich selbst wie ein idealer Rührkessel-Reaktor verhält) etwas später erreicht als für niedermolekulare Moleküle vorausberechnet werden kann.

Zur Bestimmung des Umsatzes wurde die Messung des Drehwertes der Produkt-Lösung mit einem Polarimeter bei 436 nm in einer Durchflußküvette mit 10 cm Schichtdicke durchgeführt. Die polarimetrische Eichkurve ist in Abb. 5.10. zu sehen. Zur Kontrolle wurde eine Probe der Produktlösung mit einem Aminosäure-Analyser auf ihren Alanin-Gehalt untersucht. Hierbei stellte sich heraus, daß die polarimetrisch bestimmte L-Alanin-Konzentration kleiner war, als die mit dem Aminosäure Analyser ermittelte Alanin-Konzentration.

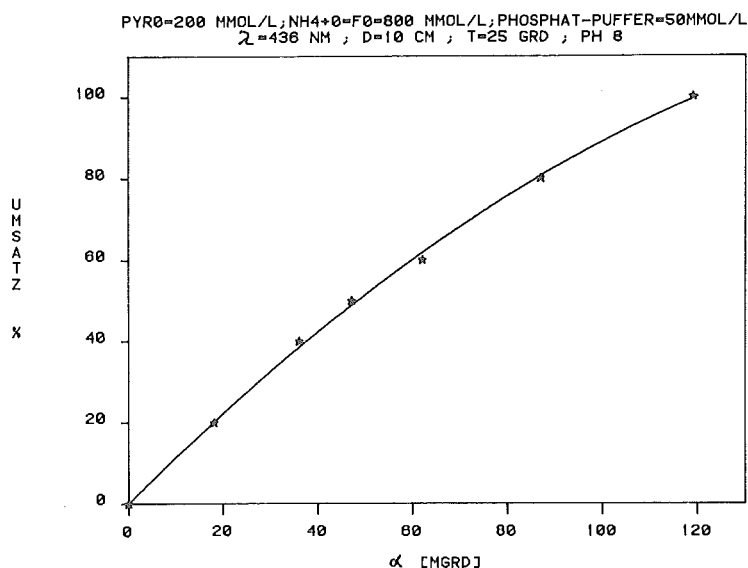


Abb. 5.10.: Eichkurve zur polarimetrischen L-Alanin-Bestimmung.

Der Grund dafür könnte in einer Bildung Schiff'scher Basen zwischen restlichem Pyruvat und dem gebildeten L-Alanin liegen. Über solche Zwischenprodukte ist eine teilweise Racemisierung des gebildeten L-Alanins denkbar. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, daß der Drehwert der Produktlösung nach 24 stündiger Lagerung deutlich kleiner ist, als unmittelbar nach Verlassen des Reaktors.

Es empfiehlt sich daher, im Gegensatz zu dem in Kapitel 4.1. berechneten optimalen Umsatz, hohe Umsätze anzustreben, um die Bildung Schiff'scher Basen über einen Mangel an Pyruvat möglichst auszuschließen und mit kurzen Verweilzeiten und hohen Katalysatorkonzentrationen zu arbeiten.

Das in Abb. 5.9. dargestellte Ergebnis stellt den Verlauf des Umsatzes an Pyruvat im EMR bzw. der entsprechenden enzymatischen Produktion an L-Alanin dar, ohne Berücksichtigung der durch Racemisierung verlorenen Menge an L-Alanin. Der Grund hierfür ist, daß bei der Bestimmung des Alanin-Gehalts einer Probe der Produktlösung, wie sie zur Überprüfung des Ergebnisses der polarimetrischen L-Alanin-Bestimmung mit einem Aminosäure Analyser durchgeführt wurde, nicht zwischen L- und D-Alanin unterschieden werden kann.

Wie in Abb. 5.9., so sind auch die folgenden Ergebnisse des Versuchs auf enzymatisch produziertes L-Alanin bezogen ohne Berücksichtigung des Anteils, der racemisiert war, bis die Produktlösung die Polarimeter-Küvette passierte.

Aus dem allmählichen Umsatzabfall mit der Betriebszeit nach Abschluß des Einspülvorgangs können mit Hilfe der kinetischen Modelle die Desaktivierung für die Enzyme und das Co-enzym berechnet werden. Für die Berechnung wurde die Betriebszeit zwischen dem 1. Tag und 4,5. Tag zugrunde gelegt. Zu Beginn dieses Zeitintervalls betrug die effektive FDH-Ak-

tivität 2,83 U/ml und die effektive ALADH-Aktivität 12,8 U/ml.
Die enzymatisch wirksame Coenzym-Konzentration betrug 5,4 mmol/l.

Die drei Desaktivierungsraten wurden als Optimierparameter mit Hilfe eines Optimierungsprogramms nach Rosenbrock gewonnen. Jeder Funktionsaufruf des Optimierprogramms setzt die Berechnung des Umsatzes über den gesamten betrachteten Betriebszeitraum voraus. Dazu war jeweils eine Lösung des Differentialgleichungssystems in einem Unterprogramm nach dem Runge-Kutta-Verfahren erforderlich. Es ergaben sich folgende Desaktivierungen pro Tag:

$$\text{DES}_{\text{FDH}} = 12,5 \% \quad (\text{gerechnet})$$

$$\text{DES}_{\text{ALADH}} = 20,1 \% \quad (\text{gerechnet})$$

$$\text{DES}_{\text{Coenzym}} = 13,6 \% \quad (\text{gerechnet})$$

Die bei diesem Versuch beobachtete hohe Enzymdesaktivierung kann wegen der kurzen Versuchsdauer mit einer erhöhten Desaktivierung zu Versuchsbeginn erklärt werden.

Die maximale Wechselzahl zum Zeitpunkt des höchsten Umsatzes für FDH betrug 25 min^{-1} , für ALADH 4200 min^{-1} und für das Coenzym $0,12 \text{ min}^{-1}$. Als Basis der Rechnung dienten die berechneten Enzym- und Coenzymkonzentrationen unter der Annahme, daß es sich bei den entsprechenden Enzymchargen um reines aktives Enzymprotein handelt.

Der Verbrauch an FDH betrug insgesamt:

$$2,8 \frac{\text{mg FDH}}{\text{g L-Alanin}} \quad \text{bzw.} \quad 3,2 \frac{\text{U}}{\text{g L-Alanin}}$$

für ALADH:

$$0,0056 \frac{\text{mg ALADH}}{\text{g L-Alanin}} \quad \text{bzw.} \quad 2,5 \frac{\text{U}}{\text{g L-Alanin}}$$

und für das Coenzym:

$$6,4 \frac{\mu\text{mol PEG-10 OOO-NAD (H)}}{\text{g L-Alanin}},$$

was einer 656 -fachen Wiederverwendung bzw. Regenerierung des Coenzym entsprach.

In 4,5 Tagen wurden 35,4 mmol L-Alanin produziert. Die maximale Raumzeitausbeute betrug:

$$83 \quad \frac{\text{g L-Alanin}}{\text{l} \cdot \text{d}} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\text{kg L-Alanin}}{\text{m}^3 \cdot \text{d}}$$

Der Durchschnittswert der Raumzeitausbeute war:

$$70 \quad \frac{\text{g L-Alanin}}{\text{l} \cdot \text{d}} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\text{kg L-Alanin}}{\text{m}^3 \cdot \text{d}}$$

FDH-LEUDH System

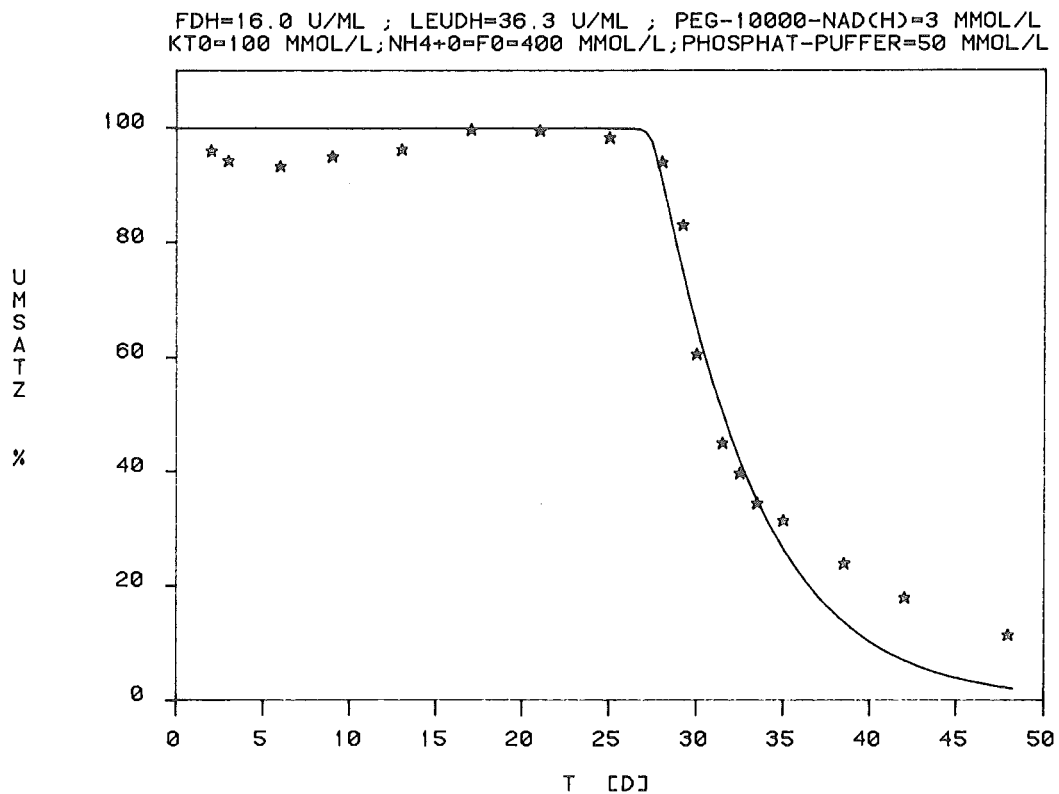


Abb. 5.11.: Kontinuierliche L-Leucin Produktion im EMR mit Coenzymregenerierung

In Abb. 5.11. ist das Ergebnis eines Experiments zur kontinuierlichen L-Leucin-Produktion aus Natrium α -Keto-Isocaproat und NH_4^+ -Formiat unter Verwendung des FDH-LEUDH Multi-Enzym Systems dargestellt.

Dem Reaktor werden zum Versuchsbeginn FDH, PEG-10 OOO-NADH und schließlich LEUDH zugeführt. Nach einem Tag wurde dem Reaktor eine Probe entnommen, um die in der Reaktionslösung befindliche Enzymaktivität zu bestimmen. Es wurden 16,0 U/ml an FDH und 36,3 U/ml an LEUDH gefunden. Die enzymatisch wirksame Coenzymkonzentration betrug 3 mmol/l.

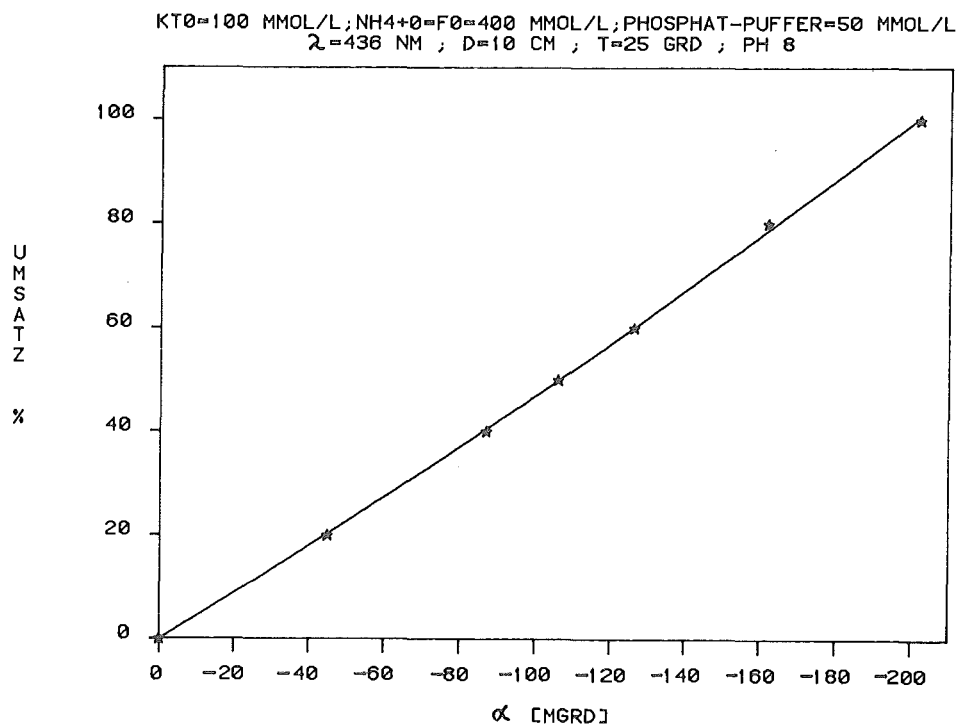


Abb. 5.12.: Eichkurve zur polarimetrischen L-Leucin Bestimmung

In Abb. 5.12. ist die polarimetrische Eichkurve abgebildet, die dazu diente, den Umsatz der Produktlösung aus dem kontinuierlich bei 436 nm mit einer Durchflußküvette (Schichtdicke 10 cm) gemessenen optischen Drehwert zu ermitteln.

Als weitere Methode zur Bestimmung der Leucin-Konzentration wurde ein enzymatischer Test unter Verwendung von L-Aminosäure Oxidase (L-AOD) durchgeführt. Wenn man die zur Erstellung der Eichkurve zur L-Leucin Analytik hergestellten Lösungen aus L-Leucin und α -Keto Isocaproat längere Zeit stehen ließ, traten ebenso wie bei der Produktlösung Abweichungen im optischen Drehwert der Lösung auf. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß auch hier in geringem Maße eine Bildung Schiff'scher Basen möglich ist. Durch eine Isolierung von L-Leucin aus der Produktlösung und Messung des optischen Drehwertes des isolierten und kristallisierten L-Leucin konnte jedoch im Gegensatz zu L-Alanin keine meßbare Racemisierung festgestellt werden.

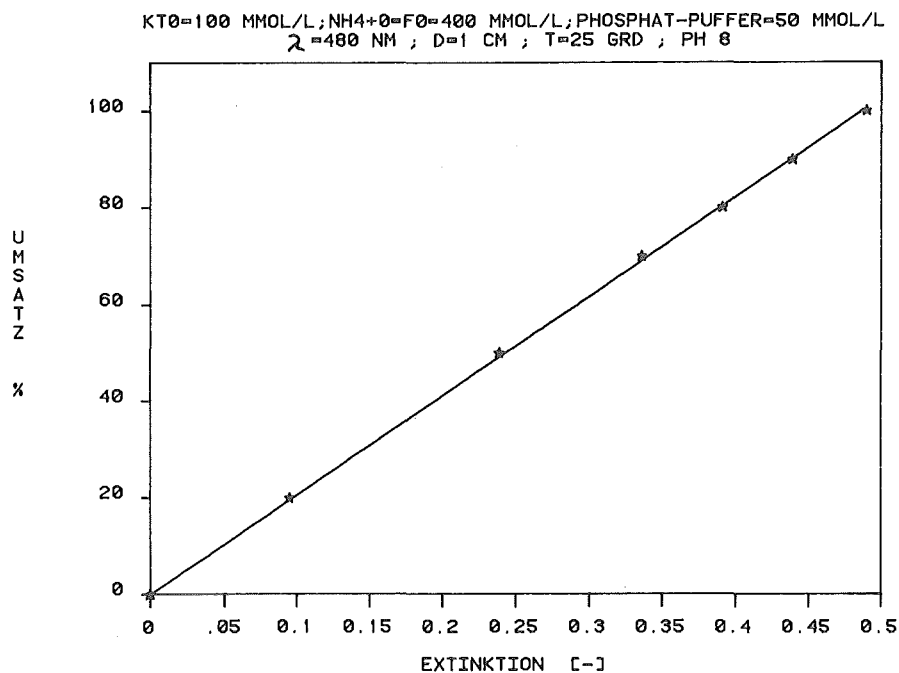


Abb. 5.13.: Eichkurve zur enzymatischen L-Leucin-Bestimmung

Die Eichkurve für den L-AOD-Test ist in Abb. 5,13. dargestellt. Mit den durch enzymatische Bestimmung ermittelten Umsatzwerten wurde der polarimetrisch ermittelte Verlauf $U = f(t)$ korrigiert.

Der Versuch wurde 48 Tage lang betrieben. Der maximale Umsatz betrug 99,7 %. Nach vier Wochen trat ein "Verlöschen" der Reaktion ein, d.h. der Umsatz ging plötzlich exponentiell zurück. Nach 48 Tagen wurde der Versuch abgebrochen und die noch im Reaktor verbliebenen Aktivitäten an FDH und LEUDH ermittelt. Es wurden 10,7 U/ml an FDH und 18,9 U/ml an LEUDH gefunden. Es gingen also 33 % der FDH und 48 % der LEUDH Aktivität verloren, was einer durchschnittlichen Desaktivierung von 0,83 % für FDH und 1,35 % für LEUDH an einem Tag entsprach.

Da am Ende des Versuchs keine enzymatisch nachweisbare Menge an Coenzym mehr gefunden wurde, dürfte die Desaktivierung des Coenzym der Hauptgrund für den Zusammenbruch des Umsatzes nach 4 Wochen sein.

Mit einem Optimierprogramm, das ein Unterprogramm zur Lösung der Differentialgleichungen der Massenbilanzen des FDH-LEUDH Systems nach dem Runge-Kutta-Verfahren benutzte, sollte durch Anpassung an den gemessenen Umsatz-Zeit-Verlauf die Desaktivierung des Coenzym ermittelt werden. Bei jedem Unterprogrammaufruf muß jeweils der gesamte Umsatz-Zeit-Verlauf berechnet werden. Da bei einer Versuchszeit von über 31 Tagen durch die Desaktivierung die Coenzym-Konzentration unter 0,01 mmol/l sank, stieg die Rechenzeit immer weiter an, da das Zeitintervall, in dem ein Umsatzschritt berechnet wurde, entsprechend der Coenzym-Konzentration immer weiter verkleinert werden mußte. Die Berechnung des gesamten Umsatz-Zeit-Verlaufes (d.h. ein Funktionsaufruf der Optimierung) dauerte mit dem verwendeten Computer (PDP 11/34 Fa. Digital Equipment) 6 Tage. Es war daher ausgeschlossen, wegen des hohen Rechenaufwands die Desaktivierung wie beim FDH-ALADH System zu berechnen.

Um aber trotzdem die Desaktivierung des Coenzym-
s zu ermitteln, wurde eine andere Methode zur Berechnung dieser
Größe verwendet. Anstatt den Umsatz-Zeit-Verlauf nach dem
Runge-Kutta-Verfahren zu berechnen, wurde der Umsatz-Zeit-
Verlauf punktweise mit einem Optimierprogramm nach Rosenbrock
berechnet. Somit wurde zur Berechnung der Coenzym-Desaktivie-
rung als Unterprogramm des Optimierprogramms ein weiteres Optimize-
rungsprogramm verwendet. Da die Berechnung von Betriebspunkten eines
EMR durch nichtlineare Regression nur für den stationären Zu-
stand des Reaktors exakte Werte liefert, ist die ermittelte
Coenzym-Desaktivierung von 16,8 %/Tag nur ein Näherungswert.

Der Unterschied im Umsatz-Zeit-Verlauf, wie er durch nichtlineare
Regression oder nach dem Runge-Kutta-Verfahren berechnet wurde,
war allerdings gering.

Für FDH und LEUDH wurden die zum Versuchsbeginn gemessenen En-
zymaktivitäten und die ermittelten Desaktivierungsraten bei
der Rechnung berücksichtigt. Das Ergebnis dieser Rechnung ist
in Abb. 5.11. als durchgezogene Kurve eingezeichnet.

Es ergaben sich die folgenden Desaktivierungen pro Tag:

$$\begin{aligned} \text{DES}_{\text{FDH}} &= 0,83 \% \text{ (gemessen)} \\ \text{DES}_{\text{LEUDH}} &= 1,35 \% \text{ (gemessen)} \\ \text{DES}_{\text{Coenzym}} &= 16,8 \% \text{ (gerechnet)} \end{aligned}$$

Die Abweichung des berechneten $U = f(t)$ -Verlaufs bei Zeiten
über 35 Tage dürfte in einer geringer werdenden Desaktivier-
ungsrate des Coenzym-
s im Bereich von Coenzym-Konzentrationen
unter 0,01 mmol/l begründet sein. Bei diesen Konzentrationen
an Coenzym wird die durchschnittliche Verweilzeit des Coenzym-
s am "active site" eines Enzyms sehr groß, da die Enzyme in über
100-fachem Überschuß im Vergleich zum Coenzym vorliegen.

Die maximale Wechselszahl zum Zeitpunkt des höchsten Umsatzes betrug für FDH $2,08 \text{ min}^{-1}$, für LEUDH $34,3 \text{ min}^{-1}$ und für das Coenzym $5,3 \text{ min}^{-1}$. Der Verbrauch an FDH betrug:

$$2,28 \quad \frac{\text{mg FDH}}{\text{g L-Leucin}} \quad \text{bzw.} \quad 2,59 \quad \frac{\text{U}}{\text{g L-Leucin}}$$

an LEUDH:

$$0,74 \quad \frac{\text{mg LEUDH}}{\text{g L-Leucin}} \quad \text{bzw.} \quad 8,5 \quad \frac{\text{U}}{\text{g L-Leucin}}$$

und für das Coenzym:

$$1,5 \quad \frac{\mu\text{mol PEG-10 OOO-NAD(H)}}{\text{g L-Leucin}}$$

was 5 200-facher Wiederverwendung oder Regenerierung des Coenzym entspricht. In 48 Tagen wurden 155 mmol L-Leucin produziert. Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute betrug:

$$62,8 \quad \frac{\text{g L-Leucin}}{\text{l} \cdot \text{d}} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\text{kg L-Leucin}}{\text{m}^3 \cdot \text{d}}$$

Der Durchschnittswert der Raum-Zeit-Ausbeute war:

$$42,5 \quad \frac{\text{g L-Leucin}}{\text{l} \cdot \text{d}} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\text{kg L-Leucin}}{\text{m}^3 \cdot \text{d}}$$

5.3.2. Reaktionsführung mit Nachdosierung von Enzymen bzw. Coenzym

Bei den im Kapitel 5.3.1. beschriebenen EMR-Versuchen wurde nur zu Beginn eine bestimmte Menge an Enzym und Coenzym in den Reaktor gegeben. Aus dem Umsatz-Abfall wurde auf die Desaktivierung der Enzyme und des Coenzym geschlossen.

Bei dem beschriebenen Versuch zur kontinuierlichen L-Leucin-Produktion wurde gezeigt, daß es möglich ist, bei hohen Enzym- und Coenzym-Konzentrationen und bei relativ hoher Verweilzeit, das Reaktionssystem für vier Wochen bei einem Umsatz von nahezu 100 % zu halten. Da bei sehr hohem Umsatz die Reaktionsgeschwindigkeit sehr stark zurückgeht, wie bei den Modellrechnungen in Kapitel 4, dargestellt wurde, und damit die Enzym- und Coenzym-Nutzung gering ist, wurde ein weiterer Versuch zur kontinuierlichen L-Leucin-Produktion im EMR durchgeführt.

Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, daß im größten Teil des Versuchszeitraums der Umsatz zwischen 50 und 90 % lag. Als Substratlösung wurde bei diesem Versuch wie bei dem unter 5.3.1. beschriebenen Versuch zur L-Leucin-Produktion eine Lösung verwendet, die auf pH 8 eingestellt war und 100 mmol/l Natrium α -Keto Isocaproat und 400 mmol/l NH_4^+ -Formiat enthielt. Da Phosphat die Stabilität von NAD(H) in wässriger Lösung nachteilig beeinflusst, wie kürzlich berichtet wurde (52), enthielt die Substrat-Lösung kein Phosphat als Puffersubstanz. Die Produkt-Lösung des im stationären Zustand befindlichen Reaktors hatte einen pH-Wert von 8.

Nachdem in den EMR eine YM5-UF-Membran eingesetzt, der Reaktor mit Ethanol sterilisiert, zuerst mit Wasser und dann mit Substrat-Lösung gespült war, wurden dem Reaktor 143 U FDH und 70,3 U LEUDH durch Einspritzen in den Substratstrom zwischen Pumpe und Sterilfilter zugeführt. Darauf wurde der in der Enzym-Lösung enthaltene Phosphatpuffer durch 100 ml Substrat-Lösung, die durch den Reaktor gepumpt wurde, verdrängt. Der Substratstrom wurde, um eine Verweilzeit von 1 Stunde zu erhalten, auf 11,3 ml/h eingestellt (das Reaktorvolumen betrug 11,3 ml). Um den Versuch zu starten, wurden in den Substratstrom vor dem Sterilfilter 11,3 μmol PEG-10 000-NADH in wässriger Lösung eingespritzt.

Zweimal während des Versuchs wurden FDH, LEUDH und PEG-10 OOO-NADH nachdosiert, um durch Desaktivierung verlorene Aktivitäten an Enzym bzw. Coenzym auszugleichen und damit den Umsatz des Reaktors wieder zu steigern. Und zwar wurden nach 9 Tagen dem EMR 12,2 U FDH, 53,6 U LEUDH und 12,8 μmol PEG-10 OOO-NADH und nach 19 Tagen 36,2 U FDH, 22 U LEUDH und 9,6 μmol PEG-10 OOO-NADH nachdosiert.

Die im Reaktor vorhandenen Enzymaktivitäten wurden durch den enzymatischen Test einer Probe von jeweils 5 μl ermittelt. Den in der Spritze zur Probenahme verbliebenen Rest an Reaktorlösung mit einberechnet, betrug der Verlust an Enzymaktivität und an Coenzym bei jeder Probenahme 0,05 %. Der Aktivitätsverlust durch die Probenahme war wesentlich niedriger als die Desaktivierung selbst.

Für eine Bestimmung der Coenzym-Konzentration im Reaktor durch eine Probenahme wäre ein wesentlich größeres Probenvolumen nötig gewesen, um nach einer chromatographischen Trennung des Coenzym aus dem Gemisch mit Enzymen und Substrat dessen Menge zu bestimmen. Hierdurch wäre jedoch das Reaktionssystem erheblich gestört worden. Um die genaue Coenzymkonzentration im Reaktionsgemisch ohne Verlust zu ermitteln, wurde der Aufbau der EMR-Anlage geändert.

Dem EMR wurde auf der Druckseite der Membran eine Bypass-Schleife hinzugefügt, wie in Abb. 5.14. und Abb. 5.15. dargestellt ist. Die Lösung aus dem Reaktor wird mit einer Schlauchpumpe durch eine Photometerküvette hindurch und - mit dem Substratstrom vereinigt - zurück in den Reaktionsraum gepumpt. Die ultrafiltrierte Produktlösung passiert gleichzeitig die Vergleichsküvette des Zweistrahl-Photometers und fließt anschließend noch wie üblich durch die Polarimeterküvette, um den Umsatz zu vermessen.

Abb. 5.14.

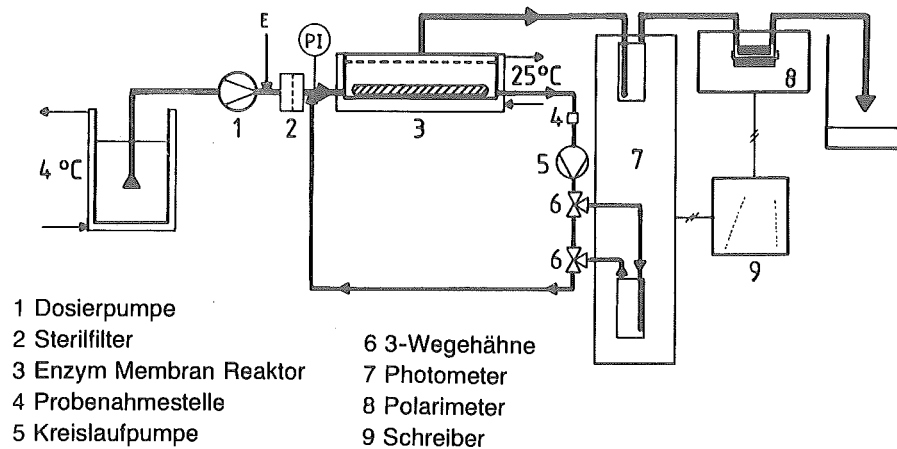


Abb. 5.15.

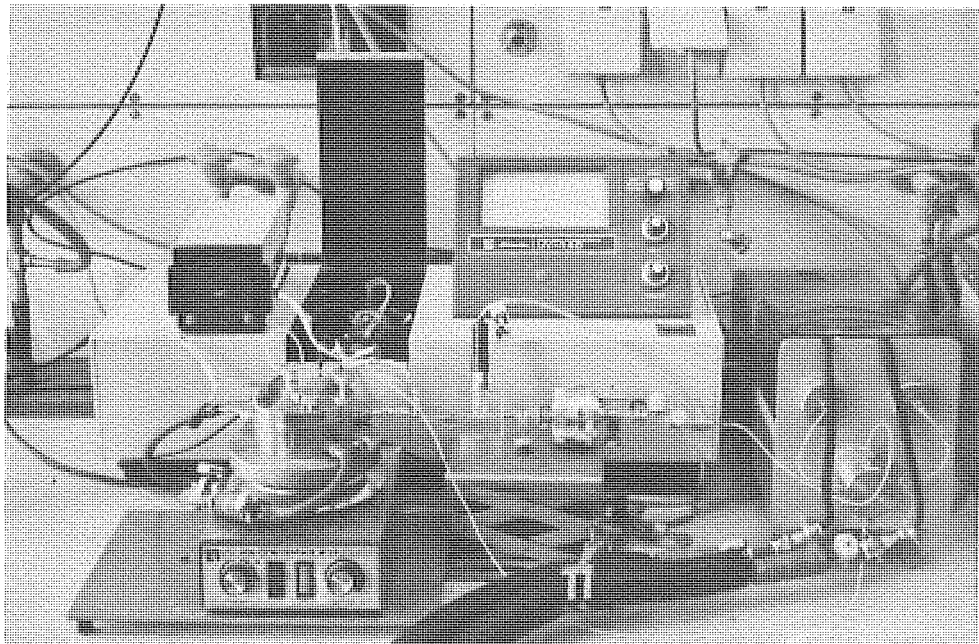


Abb. 5.14. und Abb. 5.15.: EMR mit Bypass-Schleife zur Ermittlung der Enzymaktivitäten und der Coenzym-Konzentration.

Durch diese Anordnung wird die Extinktion der Reaktionslösung im Vergleich zum Ultrafiltrat bei 340 nm vermessen. Da die Enzyme bei 340 nm keine nennenswerte Absorption haben, ergibt sich aus der gemessenen Extinktion die im Reaktionsgemisch vorhandenen PEG-10 OOO-NADH-Konzentration.

Um die im Reaktionsgemisch vorhandene PEG-10 OOO-NAD⁺-Konzentration zu bestimmen, wird die Photometerküvette im Bypass-Kreislaufstrom mit 2 Drei-Wege-Hähnen überbrückt, wie in der Detailaufnahme in Abb. 5.16. zu sehen ist, und wird somit zum Satzreaktor.

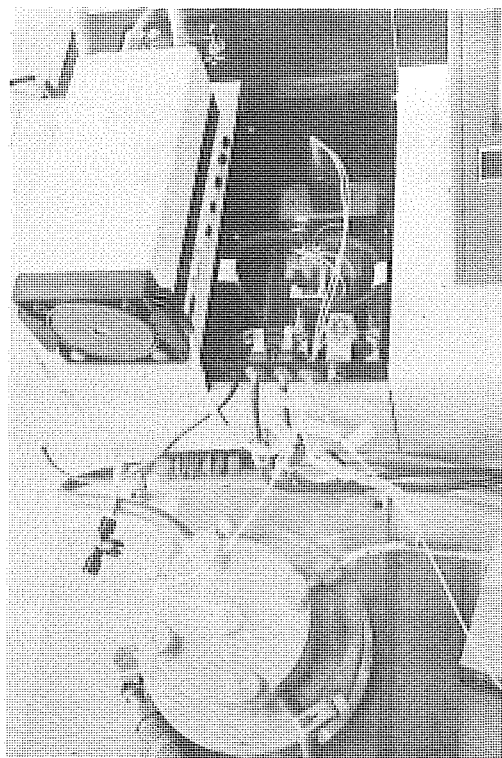


Abb. 5.16.: Detailbild des EMR mit Bypass-Schleife.

Unter den Reaktionsbedingungen im EMR liegt das Coenzym, wie in Kapitel 4.2. berechnet, überwiegend in der oxidierten Form vor. Da sich im Reaktionsgemisch ein Überschuß an Formiat befindet, reagiert alles in der als Satzreaktor arbeitenden Photometerküvette befindliche PEG-10 OOO-NAD⁺ zu PEG-10 OOO-NADH ab, wenn alles α -Keto Isocaproat zu L-Leucin verbraucht ist. Nachdem das Coenzym komplett in die reduzierte Form umgesetzt ist, wird der Inhalt der Photometerküvette wieder in den Reaktor zurückgespült, indem die Drei-Wege-Hähne wieder umgeschaltet werden.

Dadurch, daß in der Photometerküvette alle α -Ketosäure zu L-Aminosäure umgesetzt wird, stimmt die Kompensation der Extinktion durch die Produktlösung des EMR in der Vergleichsküvette nicht mehr, d.h. der Meßwert muß korrigiert werden um die Differenz der Extinktion der Produkt-Lösung des EMR und einer Lösung, die einen Umsatz von 100 % entspricht. Diese Korrektur kann rechnerisch erfolgen. Die Differenz der Extinktionen einer Lösung mit 90 % Umsatz zu einer Lösung mit 100 % Umsatz beträgt bei 1 mm Schichtdicke 0,021 Extinktionseinheiten.

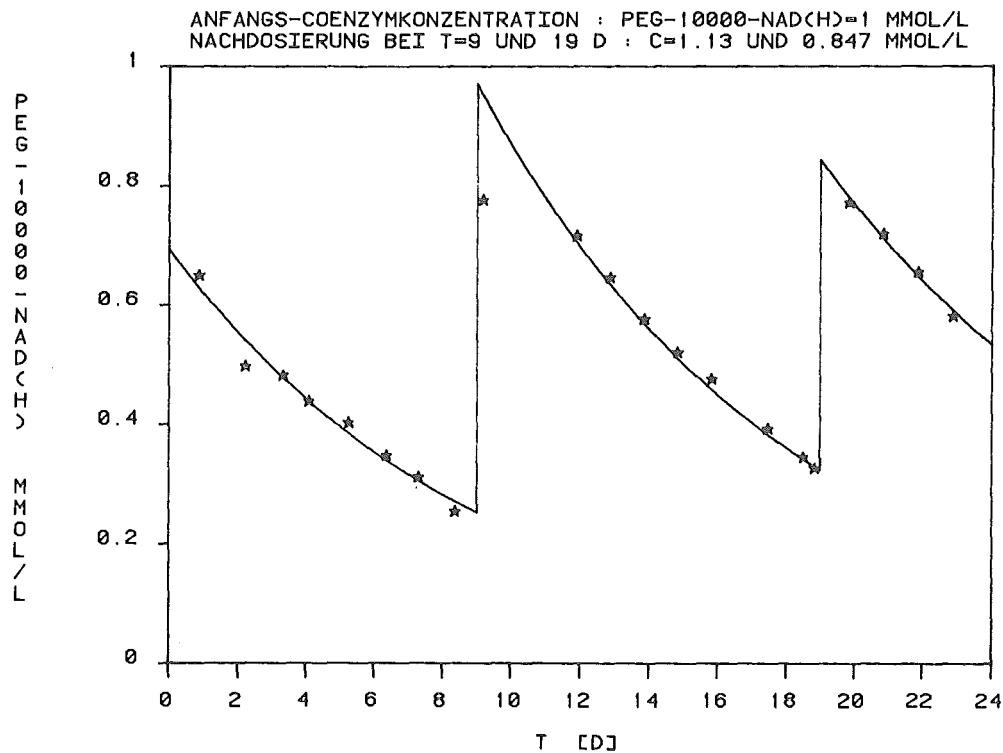


Abb. 5.17.: Konzentration des aktiven Coenzym als Funktion der Reaktionszeit.

In Abb. 5.17. ist der Verlauf der Coenzym-Konzentration im Reaktor als Funktion der Reaktionszeit dargestellt. Nach 9 und nach 19 Tagen wurde Coenzym nachdosiert. Der Verlust an Coenzym kann, wie in Abb. 5.17. dargestellt ist, gut als Reaktion erster Ordnung beschrieben werden.

Die Desaktivierungskonstanten und die Desaktivierung an einem Tag ergeben sich zu:

$$\begin{aligned} t = 0 - 9 \text{ d} : k_{\text{des}} &= 0,112 \text{ 1/d} ; \text{DES} = 10,6 \% \\ t = 9 - 19 \text{ d} : k_{\text{des}} &= 0,110 \text{ 1/d} ; \text{DES} = 10,4 \% \\ t = 19 - 23 \text{ d} : k_{\text{des}} &= 0,091 \text{ 1/d} ; \text{DES} = 8,7 \% \end{aligned}$$

Nach jeder Coenzymdosierung werden nur 60 - 70 % des zudosierten Coenzym im Reaktor wiedergefunden. Dieser Verlust an Coenzym ist vermutlich im Ausspülen von niedermolekularen Anteilen begründet, wie es bereits bei dem in Kapitel 5.2 beschriebenen Versuch beobachtet wurde (Abb. 5.5.). Diese Vermutung wird auch durch die geringer werdende Desaktivierung des Coenzym nach einer erfolgten Nachdosierung gestützt, die sich durch einen geringeren Ausspülverlust erklären läßt, da sich polymergebundenes Coenzym mit höherem Molekulargewicht ansammelt.

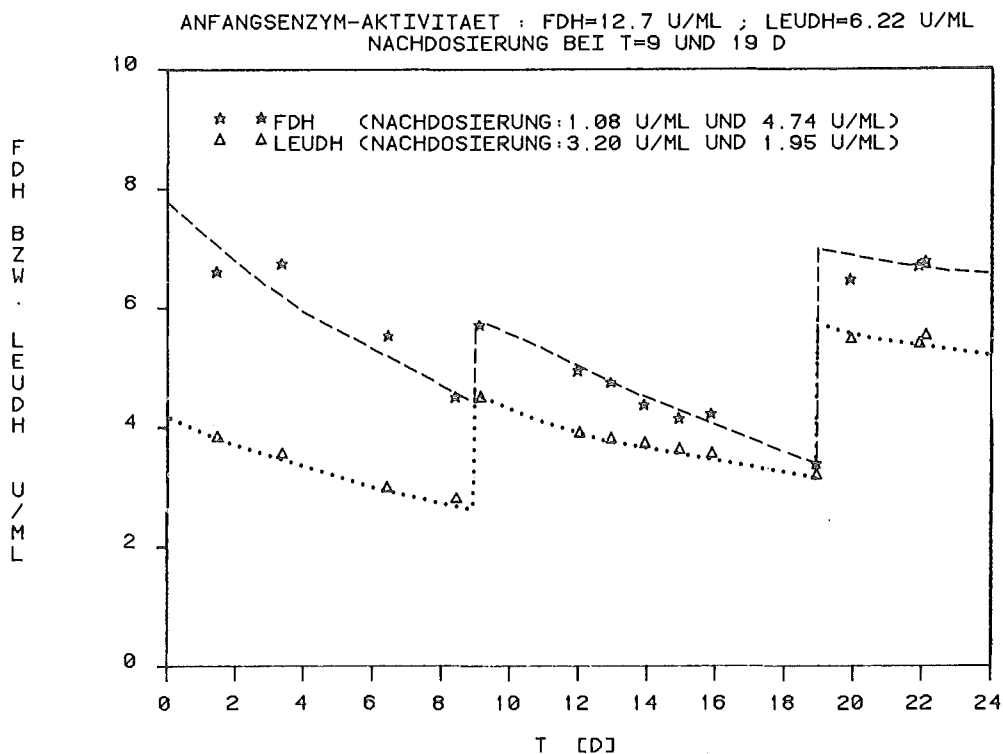


Abb. 5.18.: FDH- und LEUDH Aktivität als Funktion der Reaktionszeit.

In Abb. 5.18. ist der Verlauf der Enzym-Aktivitäten an FDH und LEUDH, wie er durch Probennahme ermittelt wurde, als Funktion der Reaktionszeit dargestellt. Von den eingesetzten Enzymaktivitäten werden zu Beginn des Experimentes nur ca. 55 bzw. 65 % in einer Probe wiedergefunden. Der Grund hierfür kann die Bildung einer Gelschicht aus Enzymproteinen auf der UF-Membran sein. Im Gegensatz zum Coenzym tritt bei den Enzymen kein meßbarer Ausspülverlust auf. Die Annahme eines Verlustes an Enzymaktivität durch Gelbildung läßt sich auch durch die Tatsache stützen, daß nach mehrmaliger Nachdosierung der Enzyme ein steigender Prozentsatz der Aktivität im Reaktor wiedergefunden wird. Für den Betriebszeitraum von 9 bis 19 Tagen ergibt sich als Desaktivierungskonstante und als Desaktivierung an einem Tag:

$$k_{\text{des-FDH}} = 0,0612 \text{ 1/d ; DES} = 5,99 \%$$

$$k_{\text{des-LEUDH}} = 0,0239 \text{ 1/d ; DES} = 2,36 \%$$

In Abb. 5.19. wird schließlich der Verlauf des Umsatzes an α -Ketosäure als Funktion der Betriebszeit des Reaktors gezeigt. Es ist der polarimetrisch ermittelte Umsatz dargestellt, dessen Verlauf durch enzymatische Tests, wie im Kapitel 5.3.1. beschrieben, kontrolliert wurde. Die polarimetrische Eichkurve und die Eichkurve des enzymatischen Tests sind in Kapitel 5.3.1. in Abb. 5.12. bzw. 5.13. dargestellt.

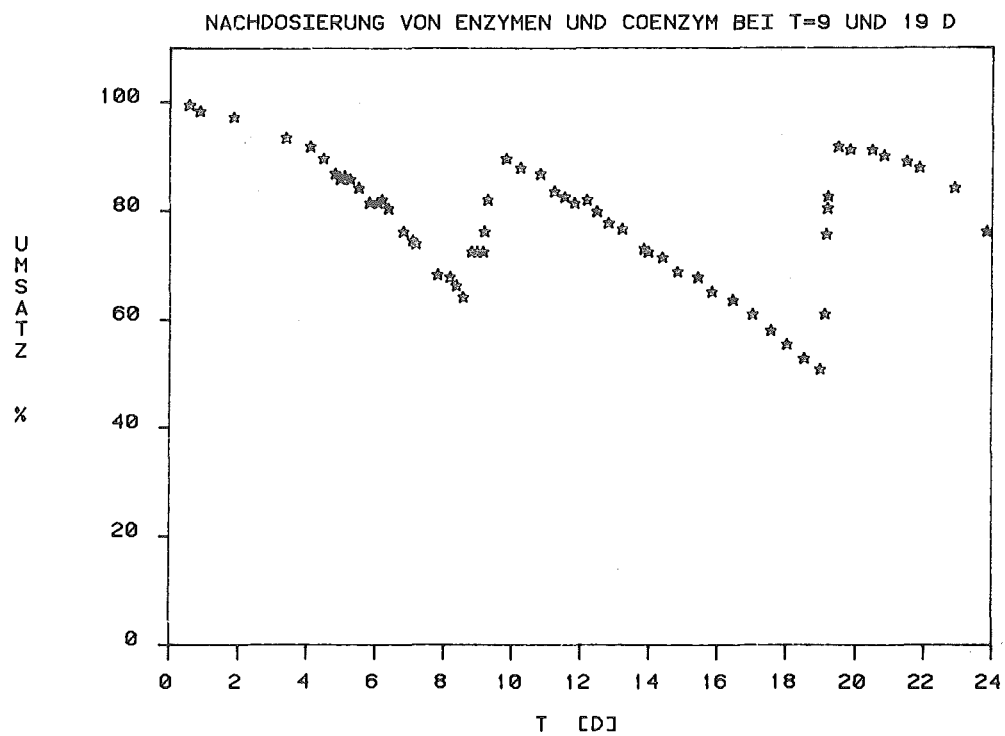


Abb. 5.19.: Kontinuierliche L-Leucin-Produktion im EMR mit Coenzymregenerierung, Umsatz an α -Keto Isocaproat bzw. Produktion an L-Leucin als Funktion der Reaktionszeit.

Eine Racemisierung des L-Leucins in der Produkt-Lösung trat nicht auf. Aus der Produkt-Lösung durch Kristallisation gewonnene Proben erreichten (ohne Umkristallisation) eine optische Reinheit von 97,5 - 99,5 %. Zum Vergleich diente von der Fa. Merck bezogenes L-Leucin.

Die maximale Wechselzahl zum Zeitpunkt des höchsten Umsatzes nach 12 Stunden - bezogen auf die im Reaktor wirksame Enzymaktivität - betrug für FDH 72 min^{-1} , für LEUDH 1070 min^{-1} und für das Coenzym $2,5 \text{ min}^{-1}$. Die Aktivität der eingesetzten Enzyme betrug für FDH 4,06 U/mg und für LEUDH 10,5 U/mg.

Über den Versuchszeitraum von 24 Tagen betrug der durchschnittliche Verbrauch an FDH:

$$0,51 \frac{\text{mg FDH}}{\text{g L-Leucin}} \quad \text{bzw. } 2,08 \frac{\text{U}}{\text{g L-Leucin}}$$

an LEUDH:

$$0,10 \frac{\text{mg LEUDH}}{\text{g L-Leucin}} \quad \text{bzw. } 1,07 \frac{\text{U}}{\text{g L-Leucin}}$$

Im gleichen Zeitraum wurden

$$0,42 \frac{\mu\text{mol PEG-10 OOO-NAD(H)}}{\text{g L-Leucin}} \quad \text{benötigt, was einer } 18200$$

fachen Regenerierung des Coenzym entspricht. Alle Werte gelten für einen mittleren Umsatz von 77 %. In den 24 Tagen wurden 502 mmol L-Leucin produziert. Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute betrug

$$313 \frac{\text{g L-Leucin}}{\text{l} \cdot \text{d}} \quad \text{bzw. } \frac{\text{kg L-Leucin}}{\text{m}^3 \cdot \text{d}}$$

Der Mittelwert über die 24 Tage betrug

$$243 \frac{\text{g L-Leucin}}{\text{l} \cdot \text{d}} \quad \text{bzw. } \frac{\text{kg L-Leucin}}{\text{m}^3 \cdot \text{d}}$$

6. Diskussion

Zur Ermittlung der optimalen Betriebsbedingungen für den Einsatz eines Enzym Membran Reaktors (EMR) zur kontinuierlichen L-Aminosäure-Synthese wurden:

- kinetische Messungen
- theoretische reaktionstechnische Berechnungen
- Untersuchungen zur Lagerstabilität der Enzyme und Coenzyme
- Versuche zum Einsatz der Einzel-Enzym-Systeme im EMR ohne Coenzymregenerierung
- Experimente zur L-Aminosäure Produktion im EMR mit Coenzymregenerierung ohne und mit Nachdosierung von Enzym und Coenzym

durchgeführt.

FDH zeigt bei Verwendung von polymergebundenem Coenzym im Vergleich zu nativem Coenzym eine höhere Aktivität, die K_m -Werte unterscheiden sich nicht wesentlich.

ALADH erreicht bei hoher Coenzymkonzentration (3 mmol/l) die gleiche Aktivität, ob nun natives oder polymergebundenen Coenzym verwendet wird, der K_m -Wert für polymergebundenen Coenzym ist 20fach größer als für natives Coenzym.

LEUDH zeigt bei Verwendung von polymergebundenem Coenzym eine um 13 % geringere Aktivität und einen 2fach höheren K_m -Wert als bei Verwendung von nativem Coenzym. FDH wird stark durch das reduzierte Coenzym inhibiert, während die Inhibierung von ALADH und LEUDH durch das oxidierte Coenzym nur gering ist.

Durch eine Substratüberschußinhibierung der ALADH durch Pyruvat ergibt sich ein Umsatzoptimum bezüglich der Enzymnutzung im FDH-ALADH System. Da NADH einen inhibierenden Einfluß auf FDH hat, wird der maximale Umsatz bei einem Überschuß an ALADH im Vergleich zu FDH im FDH-ALADH System erreicht. Unter diesen Bedingungen liegt das Coenzym überwiegend in der oxidierten Form vor.

Beim FDH-LEUDH System sinkt die Enzymnutzung mit steigendem Umsatz, wobei aber noch bei einem Umsatz von 85 % die Enzymnutzung über 90 % des maximalen Wertes bei 0 % Umsatz beträgt.

Da der K_m -Wert der LEUDH für das reduzierte Coenzym 20fach kleiner ist als der K_m -Wert der FDH für das oxidierte Coenzym, liegt bei Wahl gleicher Enzymaktivitäten im EMR das Coenzym zu über 90 % in der oxidierten Form vor. Im Gegensatz zum FDH-ALADH System wird beim FDH-LEUDH System der maximale Umsatz bei annähernd gleicher Enzymaktivität an FDH und LEUDH erreicht.

Da das oxidierte Coenzym bei einem pH-Wert über 8 zunehmend instabil wird (52), ist die Wahl von pH 8 optimal im Hinblick auf die Aktivität der Enzyme und bezüglich der Stabilität des Coenzym, das während des Versuchs im EMR mit Coenzymregenerierung überwiegend in der oxidierten Form vorliegt.

Bei einem Vergleich der Lagerstabilität der Enzyme mit der Stabilität beim Einsatz im EMR zeigt sich, daß im EMR ein wesentlicher Teil der Aktivität, abhängig von der Proteinkonzentration, durch Bildung einer Gelschicht verloren geht. Ist jedoch die Gelschicht weitgehend aufgebaut, so liegt die Desaktivierung der Enzyme im EMR in der gleichen Größenordnung wie bei der Lagerung bei gleicher Temperatur und gleichem Medium.

Beim Einsatz von PEG-10 OOO-NAD(H) im EMR in Abwesenheit von Enzymen konnte ein erhöhter Verlust an Coenzym beobachtet werden, der durch einen Ausspülverlust verursacht wurde. Der Ausspülverlust für PEG-10 OOO-NAD(H) wird durch eine Gelschicht aus Enzymprotein verringert.

Wäre der gesamte Verlust an Coenzym beim in Kapitel 5.3.2. beschriebenen Versuch durch Ausspülen zu erklären, so ergibt sich eine Retention von $R = 0,995$, die höher ist als die Retention der Membran in Abwesenheit von Enzymen. Da das Coenzym aber auch bei Lagerung im Reaktionsmedium desaktiviert, dürfte die wirkliche Retention noch besser sein.

Weil ein wesentlicher Anteil an Coenzym durch zu geringe Retention der Membran verloren geht, sollte, um den Verlust des Coenzym zu verringern, ein höheres Molekulargewicht des PEG zur Herstellung des polymergebundenen Coenzym verwendet werden. Ein Molekulargewicht des PEG von 40000 g/mol wäre günstig, da dieses selbst von einer UF-Membran mit einer nominellen Ausschlußgrenze von 10000 praktisch vollständig zurückgehalten wird. Ein solches Coenzym-Derivat wäre insbesondere für das FDH-LEUDH System gut geeignet, da bei diesem Reaktionssystem Coenzym-Konzentrationen von unter 1 mmol/l ausreichen, um eine effektive Enzymnutzung zu gewährleisten.

In einem Versuch zur kontinuierlichen Produktion von L-Leucin sollte die Produktionsleistung des EMR und die Desaktivierung von Enzym und Coenzym bei guter Katalysatornutzung, d. h. bei einem Umsatz zwischen 50 und 90 %, untersucht werden. Um den Umsatz im gewünschten Bereich zu halten, wurde eine kürzere Verweilzeit und eine geringere Enzym- und Coenzymkonzentration gewählt als beim vorhergehenden Versuch. Nach 9 Tagen und 19 Tagen wurden Enzyme und Coenzym nachdosiert. Die Enzymkonzentration wurde im Gegensatz zu den vorherigen

Experimenten durch Probenahme während des Versuchs ständig kontrolliert. Die Coenzymkonzentration im Reaktor wurde dadurch bestimmt, daß man einen Teil des Reaktorinhaltes kontinuierlich im Kreislauf durch eine Photometerküvette und zurück in den Reaktor pumpt. Hierdurch konnte durch Messung der Extinktion bei 340 nm die Konzentration an reduziertem Coenzym ermittelt werden. Stoppte man nun den Fluß durch die Küvette, so reagierte die in der Küvette verbliebene Lösung ab, bis alle Ketosäure verbraucht war. Anschließend wurde durch den Überschuß an Formiat alles oxidierte Coenzym in reduziertes Coenzym umgesetzt und die Extinktion nahm zu bis zu einem festen Endpunkt, der der Konzentration des gesamten vorhandenen Coenzym entsprach. Die Photometerküvette stellte einen Satzreaktor für das Reaktionsgemisch dar.

Bis zu einer sehr niedrigen Ketosäurekonzentration blieb das Verhältnis der Konzentration von oxidiert zu reduzierter Form annähernd konstant, nur der Abbau der Ketosäure verursachte eine Abnahme der Extinktion, da die richtige Kompensation ihrer Extinktion durch Produktlösung des EMR nicht mehr gewährleistet war. Nach Verbrauch aller Ketosäure reagierte das oxidierte Coenzym schnell ab.

Aus dem Endpunkt der sich ergebenden Extinktionszeitkurve konnte nach Korrektur der Überkompensation durch die Ketosäure die Konzentration des gesamten Coenzym ermittelt werden. Aus dem Konzentrations-Zeit-Verlauf während der Abreaktion des Reaktionsgemisches in der Photometerküvette wurde gleichzeitig mit dem schon bei den kinetischen Messungen verwendeten Mikrocomputer-System der Verlauf $R = f(\text{"scheinbare" } C_{\text{PEG-10000-NADH}})$ bestimmt.

Unter Verwendung der Massenbilanzen und der Ausgangsbedingungen dieses Versuches lassen sich die aktuelle FDH- und LEUDH-Aktivität und die NADH-Konzentration als Optimierparameter durch Anpassung an den gemessenen Kurvenverlauf $R = f(c)$

mit einem Optimierprogramm nach Rosenbrock bestimmen. In Abb. 6.1. ist für den 12.-15. Tag der gemessene Verlauf dem gerechneten Verlauf $R = f(c)$ gegenübergestellt. Durch die Desaktivierung des Coenzyms sinkt die Coenzymkonzentration von einer zur nächsten Messung immer weiter ab.

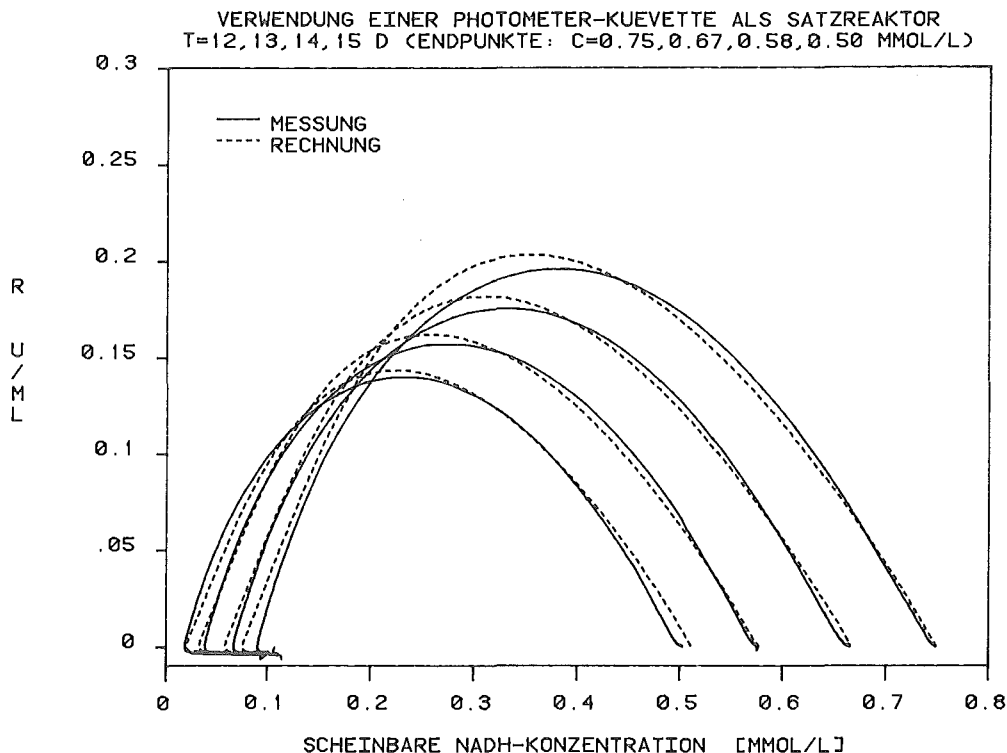


Abb. 6.1.: $R = f$ ("scheinbare" $C_{\text{PEG-10 000-NADH}}$) für das FDH-LEUDH System bei Verwendung einer Küvette als Satzreaktor.

Der Vergleich mit den durch Probenahme bestimmten Enzym-Aktivitäten führt zu folgenden Effektivitätsfaktoren im EMR: für FDH ergibt sich ein Effektivitätsfaktor von $EF = 0,63$ und für LEUDH von $EF = 1,29$. Damit werden Abweichungen zwischen durch direkte Messung im Reaktionsgemisch und durch Probenahme ermittelte Aktivitäten berücksichtigt. Bei der Aktivitätsbestimmung durch Probenahme und bei den kinetischen Messungen war die Enzym-Konzentration zwei bis drei Größenordnungen niedriger als im EMR.

In Abb.6.2. ist für den 12.-15. Tag der Verlauf der gemessenen Enzymaktivitäten dargestellt. Die Desaktivierungskonstanten wurden bestimmt und die sich daraus ergebende Ausgleichskurve ist mit eingezeichnet.

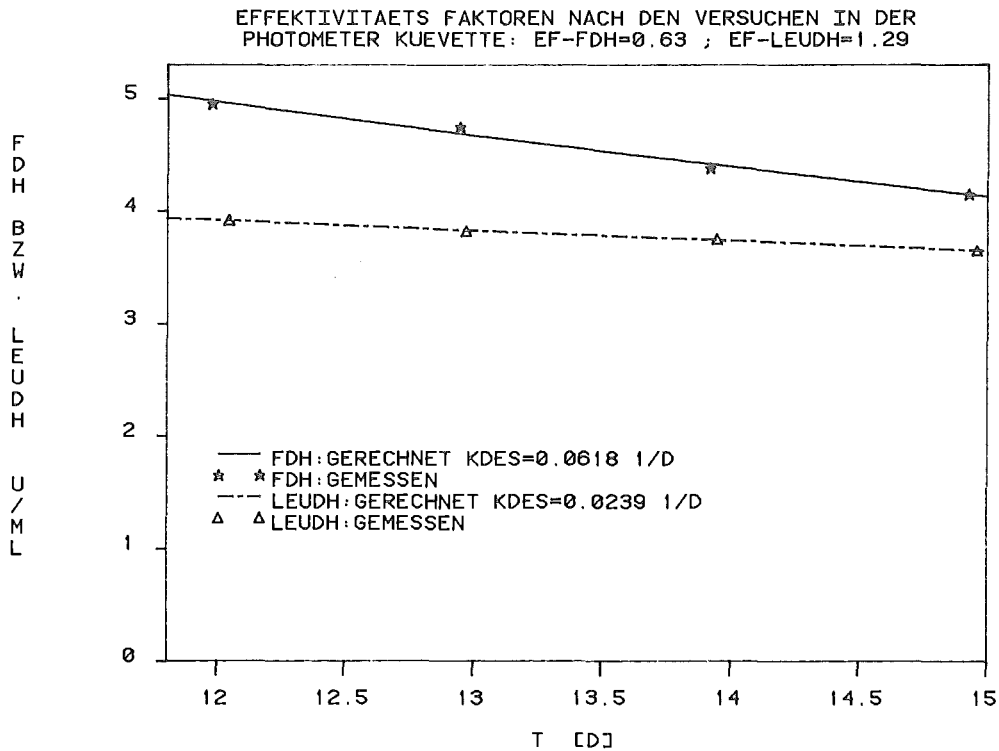


Abb.6,2.: FDH- und LEUDH-Aktivität als Funktion der Reaktionszeit für ein ausgewähltes Zeitintervall.

Da die Effektivitätsfaktoren für FDH und LEUDH, wie für diese vier Meßpunkte geprüft wurde, innerhalb von 2 % konstant sind, kann man also, nachdem man eine Einspülphase für den Reaktor abgewartet hat, die Enzymaktivität und Coenzymkonzentration aus dem Verlauf $R = f(c)$, wie er mit einem Versuch bei Verwendung einer Photometerküvette als Satzreaktor gemessen wird, durch Funktionsanpassung bestimmen.

Dieses Analyseverfahren könnte es ermöglichen, den EMR zur kontinuierlichen L-Aminosäureproduktion bezüglich der im Reaktor

vorhandenen Enzymaktivitäten und der Coenzymkonzentration durch Nachdosierung so zu regeln, daß eine konstante Produktionsleistung aufrechterhalten wird.

Bei bekannter Kinetik, Enzymdesaktivierung und Coenzymdesaktivierung kann man den Verbrauch an Enzym und Coenzym pro kg Produkt berechnen, der sich wie folgt ergibt:

Aktivitätsverlust:

$$AV = \frac{d(E \cdot V_{\max})}{dt} = k_{\text{des-Enz}} \cdot (E \cdot V_{\max}) \quad \frac{\text{U}}{\text{ml} \cdot \text{d}} \quad (6.1.)$$

Coenzymverlust:

$$COV = \frac{d C_{\text{NAD(H)}}}{dt} = k_{\text{des-NAD(H)}} \cdot C_{\text{NAD(H)}} \cdot M_{\text{NAD(H)}} \quad \frac{\text{mg NAD(H)}}{\text{l} \cdot \text{d}} \quad (6.2.)$$

Raum-Zeit-Ausbeute:

$$\eta_{\text{RZ}} = \frac{d P}{dt} = \frac{R}{V_{\max}} \cdot (E \cdot V_{\max}) \cdot M_p \quad \frac{\text{g}}{\text{l} \cdot \text{d}} \quad (6.3.)$$

Enzymverbrauch:

$$EV = \frac{AV}{\eta_{\text{RZ}}} = \frac{k_{\text{des}}}{\frac{R}{V_{\max}} \cdot M_p} \quad \frac{\text{U-Enzym}}{\text{kg Produkt}} \quad (6.4.)$$

Coenzymverbrauch:

$$CV = \frac{COV}{\eta_{\text{RZ}}} = \frac{k_{\text{des}} \cdot C_{\text{NAD(H)}} \cdot M_{\text{NAD(H)}}}{\frac{R}{V_{\max}} \cdot (E \cdot V_{\max}) \cdot M_p} \quad \frac{\text{mg NAD(H)}}{\text{kg Produkt}} \quad (6.5.)$$

$(E \cdot V_{\max})$	U/ml	Enzymaktivität
$\frac{R}{V_{\max}}$	-	dimensionslose Reaktionsgeschwindigkeit
M	g/mol	Molekulargewicht

$$k_{\text{des-FDH}} = 0,0618 \text{ 1/d} ; k_{\text{des-LEUDH}} = 0,0239 \text{ 1/d} ;$$

$$k_{\text{des-NAD(H)}} = 0,109 \text{ 1/d} ; M_{\text{NAD(H)}} = 5600 \text{ g/mol} ;$$

$$M_p = 131,18 \text{ g/mol} ;$$

Da die Coenzymkonzentration bei PEG-10000-NAD(H) bislang auf die gebundenen Coenzym-Moleküle bezogen angegeben wurden, an ein PEG Molekül aber 2 NAD(H)-Moleküle gebunden sind, beträgt das "Molekulargewicht pro NAD(H)-Molekül" von PEG-10000-NAD(H) 5600 g/mol oder 5,6 g/mmol.

Da R/V_{\max} in Kapitel 4.2. bereits als Funktion des Umsatzes berechnet wurde, kann der Verlauf des Enzym- und des Coenzymverbrauchs als Funktion des Umsatzes leicht aus dem in Abb. 4.11. dargestellten Verlauf von $R/V_{\max} = f(C_{\alpha\text{-Keto-Isocaproat}})$ berechnet werden. Der Substratverbrauch in kg Substrat pro kg Produkt ergibt sich wie folgt:

Substratverbrauch:

$$SV = \frac{M_S}{U \cdot M_p} \quad (6.6.)$$

In Abb. 6.3. ist der Substrat-, der Coenzym- und der Enzymverbrauch als Funktion des Umsatzes dargestellt.

Der Enzym- und Coenzymverbrauch ist bei 90 % Umsatz nur 12 % höher als bei 0 % Umsatz. Da bislang keine relevante Zahl be-

züglich der Katalysatorkosten vorliegt und auch der Substratpreis weitgehend von der Abnahmemenge abhängt (53), können noch keine Aussagen über wirtschaftlich optimale Betriebspunkte getroffen werden. Das Diagramm in Abb. 6.3. könnte jedoch zur Bestimmung des optimalen Betriebspunktes herangezogen werden.

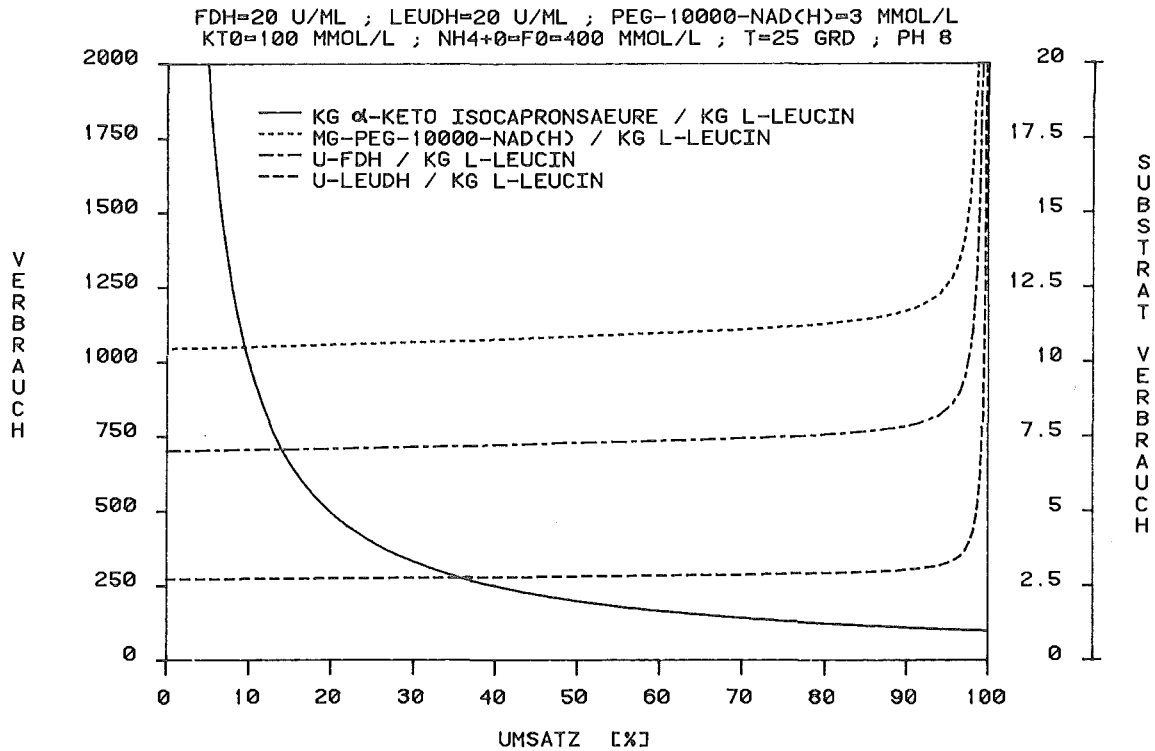


Abb. 6.3.: Substrat-, Coenzym- und Enzymverbrauch als Funktion des Umsatzes

7. Zusammenfassung

Am Beispiel NAD(H) abhängiger Reaktionen konnte gezeigt werden, daß sich das Prinzip des Enzym Membran Reaktors (EMR), eines kontinuierlichen Rührkessels, dessen Auslauf mit einer Ultrafiltrations(UF)-Membran zur Retention von Makromolekülen ausgestattet ist, auch auf coenzymabhängige Reaktionssysteme übertragen läßt.

Als Modellreaktion wurde die reduktive Aminierung von α -Ketosäuren zu L-Aminosäuren gewählt:

- 1.) Produktion von L-Alanin aus Brenztraubensäure (2-Oxo-Propansäure), katalysiert durch Alanin Dehydrogenase (ALADH, EC.1.4.1.1.) aus *Bacillus subtilis*
- 2.) Produktion von L-Leucin aus α -Keto Isocaproinsäure (2-Oxo-4-Methyl-Pentansäure), katalysiert durch Leucin Dehydrogenase (LEUDH, EC.1.4.1.9.) aus *Bacillus sphaericus*.

Um auch das Coenzym in nur katalytischen Mengen verwenden zu können, wurde es im EMR durch enzymatische Reduktion mit Formiat regeneriert. Hierzu wurde das Enzym Formiat Dehydrogenase (FDH, EC.1.2.1.2.) aus *Candida boidinii* verwendet.

Damit das Coenzym ebenso wie die Enzyme bei kontinuierlicher Reaktionsführung durch die UF-Membran des EMR im Reaktor zurückgehalten werden konnte, wurde an Polyethylenglykol (Molekulargewicht 10 000 g/mol) gebundenes NAD(H) eingesetzt (PEG-10 000-NAD(H)).

Es zeigte sich, daß auch PEG-10 000-NAD(H) coenzymatisch aktiv ist und daß es möglich ist, mit PEG-10 000-NAD(H) die Aktivität der Enzyme vergleichbar gut zu nutzen wie mit nativem NAD(H).

Die Ergebnisse der kinetischen Messungen wurden für FDH, ALADH und LEUDH bei Verwendung von nativem NAD(H) und PEG-10 OOO-NAD(H) jeweils in einem kinetischen Modell zusammengefaßt.

Zur Vereinfachung der Auswertung der kinetischen Messungen wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem mit Hilfe eines Mikrocomputers während des Experiments unmittelbar die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Konzentration ermittelt und gezeichnet wird.

Mit Kenntnis der Kinetik der Enzyme konnten durch simultane Lösung der Massenbilanzen der am jeweiligen Reaktionssystem teilnehmenden Komponenten Arbeitspunkte für die kontinuierliche Reaktionsführung zur Produktion von L-Alanin und L-Leucin im EMR berechnet werden.

Die Desaktivierung bei kontinuierlicher Reaktionsführung im EMR wurde ohne Coenzymregenerierung unter Verwendung von nativem NAD(H) für FDH und ALADH untersucht.

Die Desaktivierung und der Ausspülverlust von PEG-10 OOO-NAD(H) wurde im UF-Membran Reaktor bei Abwesenheit von Enzymen ermittelt.

Es zeigte sich, daß ein Teil der Enzyme oder des Coenzym durch Konzentrationspolarisation vor der UF-Membran der freien Lösung entzogen wird. Im Gegensatz zu den Enzymen ging durch Ausspülen durch die UF-Membran ein Teil des Coenzym verloren.

Die Desaktivierung der Enzyme und des Coenzym unter der Produktionsbedingungen wurde bei der kontinuierlichen L-Alanin und L-Leucin Produktion im EMR bei gleichzeitiger Coenzymregenerierung untersucht.

L-Alanin wurde mit einer mittleren Raum-Zeit-Ausbeute von 70 g/(l·d) 4,5 Tage lang produziert. Der Verbrauch an FDH betrug 3,2 U/(g L-Alanin), an ALADH 2,5 U/(g L-Alanin). Das Coenzym wurde 656fach regeneriert.

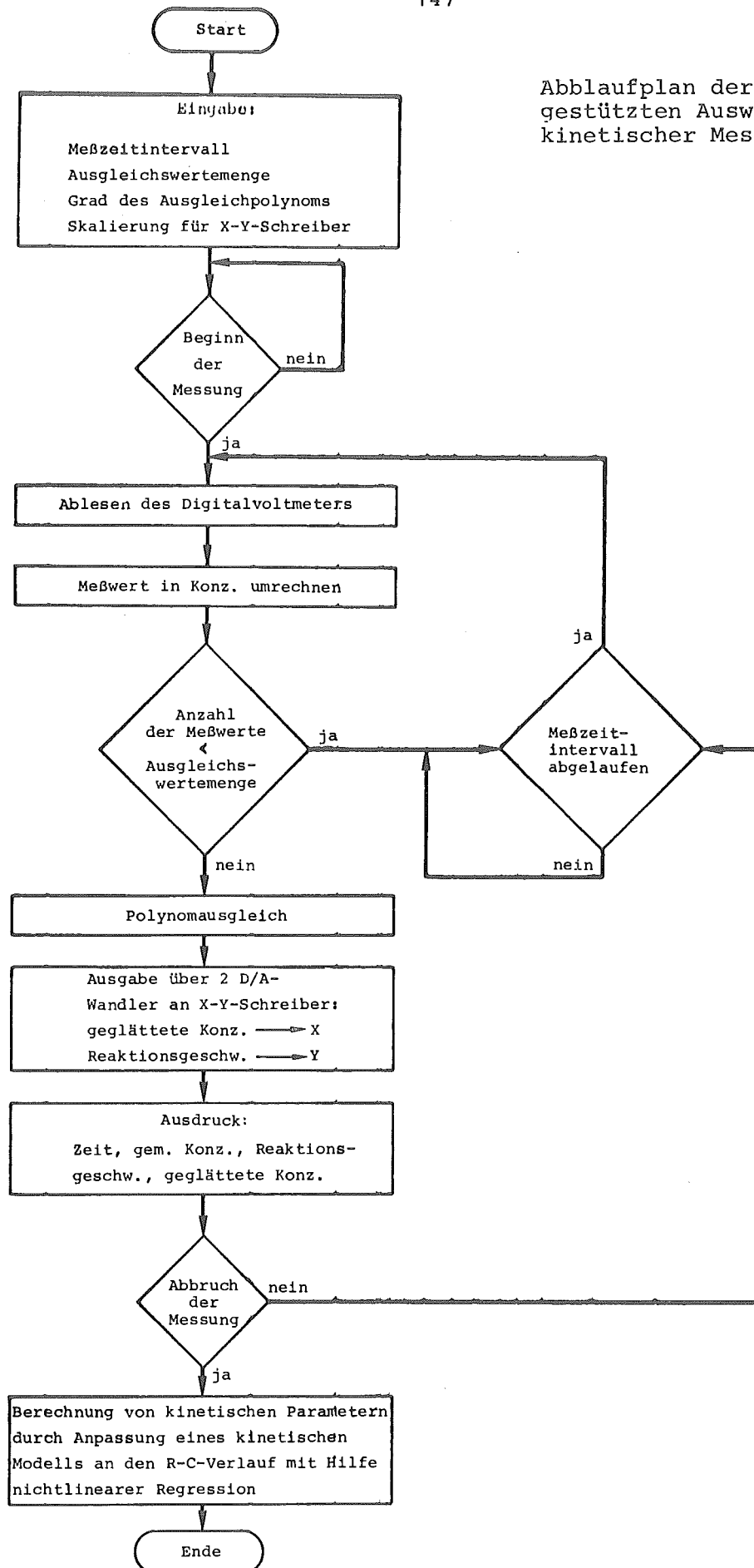
L-Leucin wurde mit einer mittleren Raum-Zeit-Ausbeute von 42,5 g/(l·d) 48 Tage lang produziert. Der Verbrauch an FDH betrug 2,6 U/(g L-Leucin) und an LEUDH 8,5 U/(g L-Leucin). Das Coenzym wurde 5200fach regeneriert.

Durch Berücksichtigung der Enzym Aktivitäten sowie der Enzym- und Coenzym-Stabilitäten konnte bei wiederholter Nachdosierung von Enzymen und Coenzym und bei geeigneter Wahl der Verweilzeit über 24 Tage eine hohe Produktivität bei geringem Katalysatorverbrauch aufrechterhalten werden. Die mittlere Raum-Zeit-Ausbeute betrug 243 g L-Leucin/(l·d) bei einem Verbrauch an FDH von 2,1 U/(g L-Leucin) und an LEUDH von 1,1 U/(g L-Leucin). Das Coenzym wurde 18 200fach regeneriert.

Es wurde eine Analysenmethode entwickelt, um die Enzymaktivitäten und die Coenzymkonzentrationen im EMR ohne Probenahme zu bestimmen.

A n h a n g

Ablaufplan der rechnerge-
stützten Auswertung enzym-
kinetischer Messungen



KINETIK AUSWERTEPROGRAMM ALR-ONLINE

```
50 REM      P R O G R A M M      ----- A L R  -  O N L I N E -----
60 REM INITIALISIERUNG DES TREIBER-PROGRAMMS FUER DEN A/D-WANDLER
70 REM UND DER 2 D/A-WANDLER, SOWIE DER ECHTZEIT-UHR DES RECHNERS
100 POKE 8256,113:POKE 8257,141
120 POKE 5123,0:POKE 5122,30:POKE 5120,0
125 POKE 5131,224:POKE 5124,94:POKE 5125,195
150 M9=0
170 REM X%-FELD=ZEIT IN SEC, Y%-FELD=MESSWERT
200 DIM X%(2500),Y%(2500)
300 D=0:R=D:S=D:X1=D:X2=D:X3=D:X4=D:Y1=D:Y2=D:Y3=D
350 INPUT "BITTE DATUM UND MESSREIHEN-NR. EINGEBEN";A$
400 PRINT "STARTWERTE FUER X,Y-SCHREIBER";
500 INPUT X,Y
600 INPUT "ZEITINTERVALL IN SEC (MINIMUM 5 SEC)";Z:X%(0)=-Z
650 Z9=Z*10:Z8=Z9-1
660 Z7=INT(Z9/256):Z9=INT(Z9-Z7*256)
670 Z6=INT(Z8/256):Z8=INT(Z8-Z6*256)
700 PRINT "CMIN,CMAX,RMIN,RMAX";
800 INPUT C0,C9,R0,R9
900 INPUT "AUSGLEICHSWERTEMENGE";M
950 INPUT "MESSWERT-OFFSET";S9
960 INPUT "SCHICHTDICKE DER KUEVETTE IN MM";S8
1000 INPUT "ONLINE ODER OFFLINE";A$
1100 O=ASC(MID$(A$,2,1))-70
1200 IF O=0 THEN 1400
1250 REM WARTEN ANWEISUNG FUER START DER MESSUNG
1300 WAIT 5121,128,128
1320 REM SETZEN DER ECHTZEIT-UHR
1350 POKE 5128,Z9:POKE 5129,Z7
1400 POKE 8256,113
1500 D=D+1
1650 IF O=0 THEN 1750
1700 X%(D)=X%(D-1)+Z:Y%(D)=A
1750 R=X%(D):S=(Y%(D)-S9)
1800 GOSUB 4150
1900 GOSUB 5000
1950 REM SIND GENUG WERTE ERFASST WORDEN FUER DEN PARABEL-AUSGLEICH
2000 IF D=>M THEN 2400
2050 V=1
2070 REM MESSWERT-NR.<ALS 1/2 AUSGLEICH-SWERTEMENGE ?
2100 IF D=>INT(0.5+M/2) THEN 2170
2130 V=2
2140 REM AUSGABE VON NR.,ZEIT(MIN),KONZ.(GEMESSEN) BIS M/2
2150 PRINT SPC(2-INT(LOG(D)/LOG(10)));D;TAB(6);R;TAB(22);S
2160 REM OFFLINE ?
2170 IF O=0 THEN 1500
2200 GOSUB 5400
2300 GOTO 1500
2400 GOSUB 6200
2450 REM HERAUSNAHME DES "AELTESTEN" WERTES DES LETZTEN AUSGLEICHS
2500 K=D-M+1:R=X%(K):S=(Y%(K)-S9)
2600 GOSUB 4150
2700 R=-R:S=-S
2800 GOSUB 5000
2900 X2=X2-2*R2:X4=X4-2*R4:Y2=Y2-2*S*R
2920 REM BETRIFFT NUR OFFLINE-RECHNUNG=IST ENDE ERREICHT ?
2930 IF D=M9 THEN 3500
2940 REM OFFLINE ?
2950 IF O=0 THEN 1400
```

KINETIK AUSWERTEPROGRAMM ALR-ONLINE

```
3000 REM ABRUCH DER MESSUNG ?
3100 IF PEEK(5121)<200 THEN 3500
3200 V=0
3400 GOTO 1400
3500 I=D-INT(M/2)+1:M9=D
3600 R=X%(I):S=(Y%(I)-S9)
3700 GOSUB 4150
3750 K1=2-INT(LOG(I)/LOG(10)):IF K1<0 THEN K1=0
3780 REM AUSDRUCK DER LETZTEN MESSWERTE
3800 PRINT SPC(K1);I;TAB(6);R;TAB(22);S
3900 I=I+1
4000 IF I=<D THEN 3600
4100 INPUT "WIEDERHOLUNG DER RECHNUNG";A$
4110 IF ASC(A$)=74 THEN 300
4112 INPUT "SOLLEN DIE MESSWERTE AUF LOCHSTREIFEN GESTANTZT WERDEN";A$
4114 IF ASC(A$)=78 THEN 4117
4116 GOSUB 10000
4117 INPUT "SOLLEN DIE MESSWERTE AUF FLOPPY DISC GESPEICHERT WERDEN";A$

4118 IF ASC(A$)=74 THEN GOSUB 43000
4120 END
4130 REM ES FOLGEN DIE UNTERPROGRAMME
4150 REM MESSWERT - KONZ.;ZEIT UMRECHNUNG
4160 REM R=ZEIT,S=MESSWERT
4170 REM UMRECHNUNG VON SEC AUF MIN UND GEMESSENEN WERT
4180 REM AM A/D-WANDLER AUF KONZENTRATION (EICHFUNKTION)
4200 R=R/60:S=S/(6220*S8)
4300 RETURN
5000 REM SUMMENBILDUNG FUER DEN PARABELAUSGLEICH
5100 X1=X1+R:X2=X2+R2:X3=X3+R3:X4=X4+R4
5200 Y1=Y1+S:Y2=Y2+S*R:Y3=Y3+S*R2
5300 RETURN
5400 REM ABFRAGE DER ECHTZEIT-UHR OB MESSINTERVALL ABGELAUFEN IST?
5450 REM UND NEUE INITIALISIERUNG DER UHR
5500 WAIT 5133,32,0
5600 POKE 5128,Z8:POKE 5129,Z6
5700 RETURN
6200 REM PARABELAUSGLEICH,NUM-DIFF,AUSDRUCK
6300 C1=Y2-X1*Y1/M:C2=X2-X12/M:C3=X3-X1*X2/M
6400 C=(Y3-X2*Y1/M-C1*C3/C2)/(X4-X22/M-C32/C2)
6500 B=(C1-C3*C)/C2:A=(Y1-X1*B-X2*C)/M
6530 R=X%(D-INT(M/2)):S=Y%(D-INT(M/2))
6540 S=(S-S9)
6550 GOSUB 4150
6600 Y=2*C*R+B:X=C*R2+B*R+A
6700 K1=2-INT(LOG(D-INT(M/2))/LOG(10))
6750 W=D-INT(M/2)
6780 IF K1<0 THEN K1=0
6790 REM W=NR.,R=ZEIT,S=KONZ.(GEMESSEN),Y=REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT
6791 REM X=KONZ.(GEGLAETTET)
6800 PRINT SPC(K1);W;TAB(6);R;TAB(22);S;TAB(38);Y;TAB(54);X;
6827 PRINT
6828 REM UMRECHNUNG DER REAKTIONSGESCHW. UND KONZ. AUF
6829 REM KOORDINATEN DES XY-SCHREIBERS
6830 Y=INT(1000*(Y-R0)/(R9-R0)):X=INT(1000*(X-C0)/(C9-C0))
6900 RETURN
7000 REM A/D - D/A SUBROUTINE
7020 REM X=X-KOORDINATE,Y=Y-KOORDINATE DES XY-SCHREIBERS
7030 REM AUSGEGEBEN WERDEN KOENNEN INTEGER-WERTE 0 BIS 1000
```

KINETIK AUSWERTEPROGRAMM ALR-ONLINE

```
7050 X=ABS(X):Y=ABS(Y)
7060 IF X>1000 THEN X=1000
7070 IF Y>1000 THEN Y=1000
7100 A3=INT(X/100)
7200 A2=INT((X-A3*100)/10)
7300 A1=INT((X-A3*100-A2*10))
7400 B3=INT(Y/100)
7500 B2=INT((Y-B3*100)/10)
7600 B1=INT(Y-B3*100-B2*10)
7700 POKE 232,A1:POKE 233,A2:POKE 234,A3
7800 POKE 235,B1:POKE 236,B2:POKE 237,B3
7900 W=USR(0)
8000 A=PEEK(232)+10*PEEK(233)+100*PEEK(234)+1000*PEEK(235)
8100 A4=PEEK(236) AND 1
8200 A=A+10000*A4
8300 W=PEEK(236) AND 4
8400 IF W=0 THEN A=-A
8500 W=PEEK(236) AND 2
8600 IF W>0 THEN A=30000
8650 REM A=ABGELESENER MESSWERT AM A/D-WANDLER
8700 RETURN
9000 REM PROGRAMM ZUM SETZEN DES XY-SCHREIBERS AUF X,Y-KOORDINATE
9050 INPUT X,Y
9100 GOSUB 7000
9200 GOTO 9000
10000 REM SUBROUTINE LOCHSTREIFEN AUSGABE
10100 GOSUB 10200
10150 GOTO 10600
10200 POKE 5889,255:POKE 5891,1:POKE 5890,0
10250 POKE 10834,66:POKE 10835,143
10300 FOR I=1 TO 60
10400 PRINT CHR$(127);
10500 NEXT I
10550 POKE 10834,160:POKE 10835,30
10570 RETURN
10600 I=0
10700 IF I=>D THEN 12000
10800 I=I+1
10900 K=SGN(Y%(I)):J=ABS(Y%(I)):B$="+":IF K<0 THEN B$="-"
11000 A$=STR$(J):A$=RIGHT$(A$,LEN(A$)-1):J=LEN(A$):IF J=>5 THEN 11500
11100 FOR K=1 TO 5-J:B$=B$+"0":NEXT K
11500 B$=B$+A$
11550 POKE 10834,66:POKE 10835,143
11600 PRINT B$;CHR$(13);CHR$(10);
11650 POKE 10834,160:POKE 10835,30
11670 PRINT
11700 GOTO 10700
12000 POKE 10834,66:POKE 10835,143
12050 FOR I=1 TO 300
12100 PRINT CHR$(0);
12200 NEXT I
12300 POKE 10834,160:POKE 10835,30
12400 RETURN
29998 REM LOCHSTREIFEN EINGABE-12 WERTE PRO ZEILE- (ZUERST PROGRAMM MI
29999 REM RUN STARTEN,MIT RETURN ABBRECHEN,DANN GOTO 30000)
30000 INPUT "ZEITINTERVALL IN SEC";Z:X%(0)=-Z
30050 J=0
30100 GOSUB 31000
30150 IF LEN(A$)<72 THEN RETURN
```


KINETIK AUSWERTEPROGRAMM ALR-ONLINE

```
30200 I=-5
30300 I=I+6:J=J+1
30400 Y%(J)=VAL(MID$(A$,I,6)):PRINT Y%(J);
30450 X%(J)=X%(J-1)+Z
30500 IF I<66 THEN 30300
30550 PRINT
30600 GOTO 30100
31000 POKE 8256,168:POKE 8257,143:POKE 5138,49:POKE 5139,0
31100 POKE 5136,32
31200 R=USR(0)
31300 A$=CHR$(PEEK(235) AND 127)
31400 ASC(A$)=19 THEN 33800
31500 IF ASC(A$)<31 OR ASC(A$)>125 THEN 31200
31600 R=USR(0)
31700 B$=CHR$(PEEK(235) AND 127)
31800 IF ASC(B$)=13 THEN RETURN
31900 IF ASC(B$)<31 OR ASC(B$)>57 THEN 31600
32000 A$=A$+B$
32100 GOTO 31600
33000 N=0
33100 N=N+1:IF N>J/12 THEN RETURN
33200 K=0
33300 K=K+1:IF K>12 THEN 33600
33400 PRINT Y%((N-1)*12+K);TAB(K*6);
33500 GOTO 33300
33600 PRINT
33700 GOTO 33100
33800 POKE 8256,113:POKE 8257,141
33900 POKE 5123,0:POKE 5122,30:POKE 5120,0
34000 M9=J
34100 END
39999 REM PROGRAMM ZUM ZEICHNEN EINER MODELLRECHNUNG DER KINETIK
40000 PRINT "CMIN,CMAX,RMIN,RMAX";:INPUT C0,C9,R0,R9
40100 PRINT "ERSTES C , LETZTES C , DELTA C ";:INPUT C6,C7,C8
40150 PRINT "FORMIAT , NAD+";:INPUT F9,N9
40200 M=(C7-C6)/C8
40300 I=0:GOSUB 40400
40310 GOSUB 6830
40315 GOSUB 7000
40320 INPUT "START";A$
40340 GOTO 40570
40399 M O D E L L
40400 X=C6+I*C8
40500 Y=0.697*(N9-X)*(F9-X)/((F9-X)+80.1)/((N9-X)+0.432*(1+X/0.22))
40550 RETURN
40570 FOR I=0 TO M
40590 GOSUB 40400
40600 PRINT I;TAB(18);X;TAB(36);Y
40700 GOSUB 6830
40800 GOSUB 7000
40900 NEXT I
41000 PRINT:PRINT:PRINT
41100 END
41998 REM LOCHSTREIFEN EINGABE-1 WERT PRO ZEILE- (ZUERST PROGRAMM MIT
41999 REM RUN STARTEN,MIT RETURN ABBRECHEN,DANN GOTO 42000)
42000 INPUT "ZEITINTERVALL IN SEC";X%(0):X%(0)=-X%(0):M9=-1
42100 M9=M9+1:INPUT A$:Y%(M9+1)=INT(VAL(A$))
42200 X%(M9+1)=X%(M9)-X%(0):GOTO 42100
43000 REM AUSGABE AUF FLOPPY DISC
```

KINETIK AUSWERTEPROGRAMM ALR-ONLINE

```
43100 PRINT "IST DIE AUSGABEDATEI ";GOSUB 45000
43200 G=G+96:D=0:Z$=CHR$(13):Z$=Z$+CHR$(10)
43300 POKE 35779,63:POKE 35780,168:POKE 35781,G
43400 A$=STR$(Z):GOSUB 45300
43500 A$=STR$(M9):GOSUB 45300
43600 D=D+1:A$=STR$(Y%(D)):GOSUB 45300
43700 IF D<>M9 THEN 43600
43750 POKE 35087,173:POKE 8256,113:POKE 8257,141
43800 PRINT "BITTE NICHT VERGESSEN DIE DATEI ZU SCHLIESSEN !"
43900 END
44000 REM EINGABE VON FLOPPY DISC
44100 PRINT "IST DIE EINGABEDATEI ";GOSUB 45000
44200 G=G+32:POKE 35448,172
44300 POKE 35779,95:POKE 35780,200:POKE 35781,G
44400 GOSUB 46400
44500 X%(0)=-V:Z=V:GOSUB 46400
44600 M9=V:D=0
44700 D=D+1:GOSUB 46400
44800 Y%(D)=V:X%(D)=X%(D-1)-X%(0):IF M9>D THEN 44700
44900 POKE 35448,32:GOTO 43750
45000 PRINT "SCHON ANGEMELDET UND"
45040 INPUT "AUF WELCHE SECONDARY ADDRESS";G
45060 IF G<2 OR G>14 THEN 45040
45100 POKE 35087,96:POKE 8256,229:POKE 8257,137
45200 POKE 6135,201:POKE 6136,139:RETURN
45300 REM SUBROUTINE AUSGABE AUF FLOPPY DISC
45400 GOSUB 45700
45500 A$=Z$:GOSUB 45700
45600 RETURN
45700 L=LEN(A$)
45800 FOR I=1 TO L
45900 B$=MID$(A$,I,1):V=ASC(B$):POKE 35784,V
46000 POKE 250,200:POKE 251,139
46100 V=USR(0)
46200 NEXT I
46300 RETURN
46400 REM SUBROUTINE EINGABE VON FLOPPY DISC
46500 GOSUB 46800
46600 V=VAL(A$)
46700 RETURN
46800 A$=" "
46850 POKE 250,200:POKE 251,139
46900 V=USR(0)
47000 IF PEEK(35784)=10 THEN 46850
47100 V=PEEK(35784):IF V<32 THEN RETURN
47200 A$=A$+CHR$(V):GOTO 46850
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
C      ROSENBROCK                      9.1.1981
C      PROGRAMM ----- R O S E N B R O C K -----
C      OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK
C
      DOUBLE PRECISION XQ,EE,EZ,EW,W,XD
      DIMENSION XD(10),H(10),XQ(10),D(10),IB(10),IG(10),W(10,10),
V(10,10),EE(10,10),EZ(10),EW(10)
      DATA NE,NA/5,5/
1111  WRITE(NE,1)
1      FORMAT('$ ANZ.PARAM. - MAX.CYCLEN - AUSG.CYCLEN = ')
      READ(NE,*) IM,NCY,IAU
      WRITE(NE,5) IM
5      FORMAT(' EING. DER ',I2,' STARTPARAM.,STARTSCHRITTW.[%],EPS[%]')
      READ(NE,*) (XD(I),I=1,IM),HO,EPS
2222  IZA = 0
      MZA = 0
      IR=1
C
      CALL ROSE(XD,IR,FD)
19     IR=IR+2
      WRITE(NA,8500)IM
8500  FORMAT(/9X,' ***** OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK UEBER ',I2,!,
' PARAMETER *****')
      WRITE(NA,8505)(XD(II),II=1,IM)
8505  FORMAT(' STARTPARAMETER: '/1X,8(G16.5)/1H ,2(G16.5)/)
      WRITE(NA,8506)FD
8506  FORMAT(' FEHLERQUADRATSUMME DER STARTPARAMETER:',G12.5/)
      WRITE(NA,8510)HO,EPS
8510  FORMAT(' STARTSCHRITTWEITE: ',G13.5,'[%], ABRUCHKRITERIUM: '!,
,G13.5,'[%]')
      WRITE(NA,8515) IM
8515  FORMAT(' ZYKLUS, ',I2,' PARAMETER, FEHLERQUADRATSUMME')
      HO = HO/100.
      EPS = EPS/100.
      FXD = FD
      DO 300 I=1,IM
      XQ(I) = XD(I)
300    CONTINUE
      FXQ = FXD
C      FESTLEGEN DES ORTHOG. EINH.-VEKTORSATZES
      DO 100 I=1,IM
      DO 100 J=1,IM
      IF(J.NE.I)V(I,J)=0.
      IF(J.EQ.I)V(I,J)=1.
100    CONTINUE
C      FESTLEGEN DER SCHRITTSTEUERUNG
111    DO 310 I=1,IM
      D(I) = 0.
      H(I) = HO
310    CONTINUE
      DO 410 J1=1,IM
      IB(J1) = 0.
      IG(J1) = 0.
410    CONTINUE
222    J = 1
333    DO 320 I=1,IM
      XQ(I) = XD(I)+XD(I)*H(J)*V(J,I)
320    CONTINUE
      CALL ROSE(XQ,IR,FQ)
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
      FXQ = FQ
      IF(FXQ.GT.FXD) GOTO 444
      IG(J) = IG(J)+1
      D(J) = H(J)+D(J)
      H(J) = 3.*H(J)
      DO 330 I=1,IM
      XD(I) = XQ(I)
330    CONTINUE
      FXD = FXQ
      GOTO 555
444    H(J) = -0.5*H(J)
      IF(IG(J).GT.0)IB(J)=IB(J)+1
555    IF(J.EQ.IM) GOTO 666
      J = J+1
      GOTO 333
C
666    DO 340 J1=1,IM
      IF(IB(J1).EQ.0) GOTO 222
340    CONTINUE
C    ABBRUCHKRITERIUM
      IB1 = 0
      DO 350 JL=1,IM
      H(JL)=ABS(H(JL))
      IF(H(JL).LT.EPS)IB1=IB1+1
350    CONTINUE
      IF(IB1.EQ.IM) GOTO 888
C
C    NEUE ORTHOGONALISIERUNG
      DO 110 J=1,IM
      DO 110 I=1,IM
      W(J,I) = 0.
      DO 110 J1=J,IM
      W(J,I) = W(J,I)+D(J1)*V(J1,I)
110    CONTINUE
C
C    ENTWICKLUNG VON V(1)
      SV = 0.
      DO 140 I=1,IM
      SV = SV+W(1,I)**2
140    CONTINUE
      SV = SQRT(SV)
      DO 150 I=1,IM
      V(1,I) = W(1,I)/SV
150    CONTINUE
C
C    BERECHNUNG DER UEBR. V(J)
      DO 160 J=2,IM
      J2 = J-1
      E = 0.
      DO 170 I=1,IM
      E = E+W(J,I)*V(J2,I)
170    CONTINUE
      DO 180 I=1,IM
      EE(J2,I) = E*V(J2,I)
180    CONTINUE
      DO 190 I=1,IM
      EZ(I) = 0.
      DO 190 N=1,J2
      EZ(I) = EZ(I)+EE(N,I)
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
190  CONTINUE
      SE = 0.
      DO 210 I=1,IM
        EW(I) = W(J,I)-EZ(I)
        SE = SE+EW(I)**2
210  CONTINUE
      SE = SQRT(SE)
      DO 160 I=1,IM
        V(J,I) = EW(I)/SE
160  CONTINUE
      IZA = IZA+1
      IF(IZA.EQ.NCY) GOTO 777
      LOS=MZA*IAU+1
      IF(IZA.EQ.LOS) GOTO 3333
      GOTO 111
3333  WRITE(NA,9990) IZA,(XD(I),I=1,IM),FXD
9990  FORMAT(2X,I3,2X,8(G14.5),/1H+,7X,3(G14.5))
      WRITE(5,1234)
1234  FORMAT(/)
      MZA = MZA+1
      GOTO 111
C
C  AUSGABE
777  WRITE(NA,9950) IZA,(XD(I),I=1,IM),FXD
9950  FORMAT(2X,I3,2X,8(G14.5)/1H+,7X,3(G14.5)/)
888  WRITE(NA,9955)
9955  FORMAT(' ENDE DER OPTIMIERUNG')
9999  END
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
C      REAKTOR SIMULATION      20.1.81
      SUBROUTINE ROSE(KK,IW,EFF)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
C      -----
C      UNTERPROGRAMM ZUR BERECHNUNG VON BETRIEBSPUNKTEN
C      FUER DEN ENZYM MEMBRAN REAKTOR NACH DEM RUNGE KUTTA VERFAHREN
C      UND ERMITTLUNG DER FEHLERQUADRATSUMME ZUR BESTIMMUNG
C      DER EFFEKTIVITAETSFAKTOREN FUER FDH UND LEUDH
C      SOWIE ZUR BESTIMMUNG DES ANTEILS DES COENZYMATISCH-
C      -AKTIVEN ANTEILS DER GEMESSENEN ANFANGS-KONZENTRATION
C      AN 'NADH'.
C      -----
      EXTERNAL FCN
      EXTERNAL OUTPUT
      DIMENSION Y(3),DERY(3),AUX(8,3),PARAM(7)
      DOUBLE PRECISION K8(5),K9(3),C(11),KK(10),K(10)
      REAL EFF
      BYTE FLNM(40)
      COMMON IR,K8,K9,DDD,C,K,MQQ,MZZ
      IR=IW
      DO 800 I=1,3
800    K(I)=KK(I)
      IF(IR.GT.1) GOTO 401
C1    IR=1
      FMM=1.0E+30
      WRITE(5,100)
100    FORMAT(' EINGABE-FILENAME FUER DATEN')
      READ(5,101) FLNM
101    FORMAT(40A1)
      FLNM(40)=0
      CALL ASSIGN(1,FLNM)
      WRITE(5,402)
402    FORMAT(' NAD+ , NADH (PHOTOMETR.)')
      READ(5,*) Y1,C(11)
      C(3)=Y1
      WRITE(5,1111)
1111   FORMAT(' F-KETO,F-FORM')
      READ(5,*) Y2,Y3
      WRITE(5,2)
2      FORMAT(' TANF,TENDE,DELTA-T (SEC)=')
      READ(5,*) P1,P2,P3
      P3=P3/60.0
C      WRITE(5,3)
3      FORMAT(' OBERE FEHLERGRENZE (ABSOLUT)=')
C      READ(5,*) PARAM(4)
      WRITE(5,9)
9      FORMAT(' AUSGABE CYCLEN (SEC) =')
      READ(5,*) PARAM(6)
      PARAM(6)=PARAM(6)/60.0
401    PARAM(7)=PARAM(6)
      Y(1)=Y1/(Y1+C(11)*K(1))
      Y(2)=Y2
      Y(3)=Y3
      PARAM(1)=P1
      PARAM(2)=P2
      PARAM(3)=P3
      PARAM(4)=1.0E-08
      DERY(1)=1.0/3.0
      DERY(2)=DERY(1)
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBRÖCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```

      DERY(3)=1.0-DERY(1)-DERY(2)
      NDIM=3
      C(10)=0.0
      IF(K(1).GT.(1.0)) GOTO 78
      DO 77 I=1,3
77    IF(K(I).LE.(0.0)) GOTO 78
      GOTO 79
78    EFF=1.0E+30
      RETURN
79    CALL RKGS(PARAM,Y,DERY,NDIM,IHLF,FCN,OUTPUT,AUX)
      EFF=C(10)
      IF (IHLF.LE.10) GOTO 80
      WRITE(5,4)
4     FORMAT(' DELTA-T WAR ZU GROSS')
      EFF=1.0E+30
80    CONTINUE
      IF(FMM.LT.EFF) GOTO 811
      FMM=EFF
C     AUSGABE DER FEHLERQUADRATSUMME, DER OPTIMIERPARAMETER
C     DER ZAHL DER VON DER OPTIMIERUNG BERUECKSICHTIGTEN
C     UND UNBERUECKSICHTIGTEN MESSPUNKTE.
      WRITE(5,5) EFF,K(1),K(2),K(3),MQQ,MZZ
5     FORMAT(1H+,'EFF=',G13.5,'K=',3(G13.5,1X),I3,1X,I3)
C     IF (DDD.EQ.1.0) WRITE(2,5) C(7),C(8)
C     CALL CLOSE(1)
C     WRITE(5,99)
99    FORMAT(' SOLL DIE DRUCK-DATEI ABGESCHLOSSEN WERDEN?')
C     READ(5,6) MM
C     IF (MM.EQ.2HJA) CALL CLOSE(2)
C     CALL CLOSE(3)
C     WRITE(5,7)
7     FORMAT(/' ENDE DER RECHNUNG?')
C     READ(5,6) MM
6     FORMAT(A2)
C     IF (MM.NE.2HJA) GOTO 1
811   CONTINUE
      RETURN
      END
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
C
C      DEFINITION DER DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN UND INPUT SUBROUTINE
C
      SUBROUTINE FCN(X,Y,DERY)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
      DIMENSION Y(1),DERY(1)
      DOUBLE PRECISION K8(5),K9(3),K(6),CEDES,EDESL,EDESF
      DOUBLE PRECISION V2,V1,NO,PO,HO,AO,E2,E1,T1,P
      DOUBLE PRECISION FO,F,H4,A,R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7
      DOUBLE PRECISION G1,G2,N,N1,N2,C(11),NN,KK(10)
      COMMON IR,K8,K9,DDD,C,KK,QQQ,MZZ
      IF(IR.GT.1) GOTO 401
      IR=2
C      HIER : BERECHNUNG DES ANFAHRVORGANGS ZUM BETRIEB
C      EINES ENZYM-MEMBRAN-REAKTORS
C      REAKTIONSSYSTEM : FDH - LEUDH MIT PEG-10000-NAD+/NADH
      DATA EDESL,EDESF,CEDES,K9/0.0,0.0,0.0,0.333,269.0,0.17/
      DATA K8/0.0144,0.428,0.018,223.0,0.732/
      DATA N2,FO,NO,PO,HO/0.0,400.0,3.0,100.0,400.0/
      V1=0.0025
      V2=1.0
      DDD=0.0
      WRITE(5,1212)
1212  FORMAT(' AUSGABE AUF MAGNETPLATTE ALS FOR002.DAT: JA=1')
      READ(5,*) DDD
      WRITE(5,1818)
1818  FORMAT(' DESAKTIVIERUNGS-COEFF.:0=0%,0.1=10%/TAG=1.+2.ENZ,3.COENZ.')
```

READ(5,*) EDESF,EDESL,CEDES
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,1818)
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,*) EDESF,EDESL,CEDES
V3=V1
V4=V2

1000 CONTINUE
WRITE(5,3)
3 FORMAT(' NAD+0,FO [MMOL/L]=')
READ(5,*) N2,FO
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,3)
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,*) N2,FO
WRITE(5,4)
4 FORMAT(' NADHO,KTO,NH4+0 [MMOL/L]=')
READ(5,*) NO,PO,HO
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,4)
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,*) NO,PO,HO
N2=C(3)

1150 CONTINUE
WRITE(5,5)
5 FORMAT(' FDH,LEUDH [U/ML]=')
READ(5,*) E2,E1
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,5)
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,*) E2,E1
WRITE(5,6)
6 FORMAT(' 1/TAU [1/MIN] =')

1200 READ(5,*) T1
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,6)
IF (DDD.EQ.1) WRITE(2,*) T1
QQQ=DDD
C WRITE(5,1212)
C READ(5,*) DDD
C CEDES=1.0/1440.0*DLOG(1.0-CEDES)

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```

EDESL=1.0/1440.0*DLOG(1.0-EDESL)
EDESF=1.0/1440.0*DLOG(1.0-EDESF)
C(9)=P0*Y(2)
401 V3=0.0025*E1*KK(2)
V4=E2*KK(3)
N0=C(11)*KK(1)
NN=N0+N2
P=P0*Y(2)
N=NN*DEXP(X*CEDES)
C(3)=N
C(4)=P0
N1=Y(1)*N
N=N-N1
F=F0*Y(3)
C(6)=F0
A=P0*(1.0-Y(2))
H4=H0-A
C(5)=H0

C
C
C
LOESUNG DER DIFFERENTIAL-GLEICHUNGEN

V1=V3*DEXP(X*EDESL)
V2=V4*DEXP(X*EDESF)
G1=V1*N*P*H4/(N+K8(1)*(1.0+N1/K8(2)))
G1=G1/(P+P*P/K8(4)+K8(3)*(1.0+A/K8(5)))
G2=V2*N1*F/((N1+K9(1)*(1.0+N/K9(3)))*(F+K9(2)))
C(1)=G1
C(2)=G2
DERY(1)=(G1-G2)/(N+N1)
DERY(2)=T1*(1.0-Y(2))-G1/P0
DERY(3)=T1*(1.0-Y(3))-G2/F0
RETURN
END
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```

C
C      AUSGABE ROUTINE
C
      SUBROUTINE OUTPUT(X,Y,DERY,IHLF,NDIM,PARAM)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
      DIMENSION Y(1),DERY(1),PARAM(1)
      DOUBLE PRECISION K8(5),K9(3),P,N1,N,F,H4,A,R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7
      DOUBLE PRECISION C(11),K(10)
      REAL T(500),YY(500)
      COMMON IR,K8,K9,DDD,C,K,MQQ,MZZ
      IF (IR.GT.2) GOTO 10
      IR=3
      KK=0
      CAA=99999.9
      RAA=0.0
      READ(1,*) M9,DUMMY
      DO 30 I=1,M9
30      READ(1,*) T(I),YY(I)
      CALL CLOSE(1)
      MM=1
      MQ=0
      MZ=0
10      IF (X.LT.(0.5)) GOTO 25
      PARAM(7)=PARAM(7)+PARAM(6)
      P=C(4)*Y(2)
      N1=Y(1)*C(3)
      N=C(3)-N1
      F=C(6)*Y(3)
      A=C(4)*(1.0-Y(2))
      H4=C(5)-A
      U=1.0-Y(2)
      R1=100.0*(N1/(K9(1)*(1.0+N/K9(3))+N1))
      R2=100.0*(F/(K9(2)+F))
      R3=R1*R2/100.0
      R4=100.0*H4/400.0
      R5=100.0*(P/(K8(3)*(1.0+A/K8(5))+P+P*P/K8(4)))
      R6=100.0*(N/(K8(1)*(1.0+N1/K8(2))+N))
      R7=R4*R5*R6/10000.0
      C(7)=R7
      C(8)=R3
      CCC=C(2)-C(1)
C
C      -----
C      BERECHNUNG DES VERLAUFS DC/DT=F(NADH(PHOTO.))
C      FUER EINEN VERSUCH BEI VERWENDUNG EINER PHOTOMETER
C      KUEVETTE ALS SATZREAKTOR
      N=N-(C(9)-C(4)*Y(2))/292.0+(1.0-K(1))*C(11)
      CCC=CCC-C(1)/292.0
C      -----
      IF(KK.EQ.1) GOTO 4001
4003      IF(YY(MM).GT.0.0) GOTO 4002
      MM=MM+1
      IF(MM.LE.M9) GOTO 4003
      GOTO 20
4002      KK=1
4001      IF(CCC.LT.0.0) GOTO 4007
4004      IF(N.GE.T(MM)) GOTO 4005
      CAA=N
      IF(CCC-RAA) 4006,4007,4007
4007      RAA=CCC

```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
      GOTO 25
4006  IF(CCC.GT.0.0005) GOTO 4007
4008  C(10)=C(10)+(YY(MM)**2)
      MZ=MZ+1
      MM=MM+1
      IF(MM.LE.M9) GOTO 4008
      GOTO 20
4005  IF(CAA.LT.1000.0) GOTO 4009
      C(10)=C(10)+(YY(MM)**2)
      MZ=MZ+1
      GOTO 4010
4009  C(10)=C(10)+((T(MM)-CAA)/(N-CAA)*(CCC-RAA)+RAA-YY(MM))**2
      MQ=MQ+1
4010  MM=MM+1
      IF(MM.LE.M9) GOTO 4004
20    PARAM(5)=1.0
      MZZ=MZ
      MQQ=MQ
      MZ=0
      MQ=0
      MM=1
      CAA=99999.9
      RAA=0.0
      KK=0
25    RETURN
      END
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
C
C .....
C
C SUBROUTINE RKGS AUS DER SCIENTIFIC SUBROUTINE PACKAGE
C FA.DIGITAL EQUIPMENT
C
C PURPOSE
C TO SOLVE A SYSTEM OF FIRST ORDER ORDINARY DIFFERENTIAL
C EQUATIONS WITH GIVEN INITIAL VALUES.
C
C USAGE
C CALL RKGS (PRMT,Y,DERY,NDIM,IHLF,FCT,OUTP,AUX)
C PARAMETERS FCT AND OUTP REQUIRE AN EXTERNAL STATEMENT.
C
C DESCRIPTION OF PARAMETERS
C PRMT - AN INPUT AND OUTPUT VECTOR WITH DIMENSION GREATER
C OR EQUAL TO 5, WHICH SPECIFIES THE PARAMETERS OF
C THE INTERVAL AND OF ACCURACY AND WHICH SERVES FOR
C COMMUNICATION BETWEEN OUTPUT SUBROUTINE (FURNISHED
C BY THE USER) AND SUBROUTINE RKGS. EXCEPT PRMT(5)
C THE COMPONENTS ARE NOT DESTROYED BY SUBROUTINE
C RKGS AND THEY ARE
C PRMT(1)- LOWER BOUND OF THE INTERVAL (INPUT),
C PRMT(2)- UPPER BOUND OF THE INTERVAL (INPUT),
C PRMT(3)- INITIAL INCREMENT OF THE INDEPENDENT VARIABLE
C (INPUT),
C PRMT(4)- UPPER ERROR BOUND (INPUT), IF ABSOLUTE ERROR IS
C GREATER THAN PRMT(4), INCREMENT GETS HALVED.
C IF INCREMENT IS LESS THAN PRMT(3) AND ABSOLUTE
C ERROR LESS THAN PRMT(4)/50, INCREMENT GETS DOUBLED.
C THE USER MAY CHANGE PRMT(4) BY MEANS OF HIS
C OUTPUT SUBROUTINE.
C PRMT(5)- NO INPUT PARAMETER. SUBROUTINE RKGS INITIALIZES
C PRMT(5)=0. IF THE USER WANTS TO TERMINATE
C SUBROUTINE RKGS AT ANY OUTPUT POINT, HE HAS TO
C CHANGE PRMT(5) TO NON-ZERO BY MEANS OF SUBROUTINE
C OUTP. FURTHER COMPONENTS OF VECTOR PRMT ARE
C FEASIBLE IF ITS DIMENSION IS DEFINED GREATER
C THAN 5. HOWEVER SUBROUTINE RKGS DOES NOT REQUIRE
C AND CHANGE THEM. NEVERTHELESS THEY MAY BE USEFUL
C FOR HANDING RESULT VALUES TO THE MAIN PROGRAM
C (CALLING RKGS) WHICH ARE OBTAINED BY SPECIAL
C MANIPULATIONS WITH OUTPUT DATA IN SUBROUTINE OUTP.
C Y - INPUT VECTOR OF INITIAL VALUES. (DESTROYED)
C LATERON Y IS THE RESULTING VECTOR OF DEPENDENT
C VARIABLES COMPUTED AT INTERMEDIATE POINTS X.
C DERY - INPUT VECTOR OF ERROR WEIGHTS. (DESTROYED)
C THE SUM OF ITS COMPONENTS MUST BE EQUAL TO 1.
C LATERON DERY IS THE VECTOR OF DERIVATIVES, WHICH
C BELONG TO FUNCTION VALUES Y AT A POINT X.
C NDIM - AN INPUT VALUE, WHICH SPECIFIES THE NUMBER OF
C EQUATIONS IN THE SYSTEM.
C IHLF - AN OUTPUT VALUE, WHICH SPECIFIES THE NUMBER OF
C BISECTIONS OF THE INITIAL INCREMENT. IF IHLF GETS
C GREATER THAN 10, SUBROUTINE RKGS RETURNS WITH
C ERROR MESSAGE IHLF=11 INTO MAIN PROGRAM. ERROR
C MESSAGE IHLF=12 OR IHLF=13 APPEARS IN CASE
C PRMT(3)=0 OR IN CASE SIGN(PRMT(3)).NE.SIGN(PRMT(2)-
C PRMT(1)) RESPECTIVELY.
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

C FCT - THE NAME OF AN EXTERNAL SUBROUTINE USED. THIS
C SUBROUTINE COMPUTES THE RIGHT HAND SIDES DERY OF
C THE SYSTEM TO GIVEN VALUES X AND Y. ITS PARAMETER
C LIST MUST BE X,Y,DERY. SUBROUTINE FCT SHOULD
C NOT DESTROY X AND Y.
C OUTP - THE NAME OF AN EXTERNAL OUTPUT SUBROUTINE USED.
C ITS PARAMETER LIST MUST BE X,Y,DERY,IHLF,NDIM,PRMT.
C NONE OF THESE PARAMETERS (EXCEPT, IF NECESSARY,
C PRMT(4),PRMT(5),...) SHOULD BE CHANGED BY
C SUBROUTINE OUTP. IF PRMT(5) IS CHANGED TO NON-ZERO,
C SUBROUTINE RKGS IS TERMINATED.
C AUX - AN AUXILIARY STORAGE ARRAY WITH 8 ROWS AND NDIM
C COLUMNS.

C REMARKS

C THE PROCEDURE TERMINATES AND RETURNS TO CALLING PROGRAM, IF
C (1) MORE THAN 10 BISECTIONS OF THE INITIAL INCREMENT ARE
C NECESSARY TO GET SATISFACTORY ACCURACY (ERROR MESSAGE
C IHLF=11),
C (2) INITIAL INCREMENT IS EQUAL TO 0 OR HAS WRONG SIGN
C (ERROR MESSAGES IHLF=12 OR IHLF=13),
C (3) THE WHOLE INTEGRATION INTERVAL IS WORKED THROUGH,
C (4) SUBROUTINE OUTP HAS CHANGED PRMT(5) TO NON-ZERO.

C SUBROUTINES AND FUNCTION SUBPROGRAMS REQUIRED

C THE EXTERNAL SUBROUTINES FCT(X,Y,DERY) AND
C OUTP(X,Y,DERY,IHLF,NDIM,PRMT) MUST BE FURNISHED BY THE USER.

C METHOD

C EVALUATION IS DONE BY MEANS OF FOURTH ORDER RUNGE-KUTTA
C FORMULAE IN THE MODIFICATION DUE TO GILL. ACCURACY IS
C TESTED COMPARING THE RESULTS OF THE PROCEDURE WITH SINGLE
C AND DOUBLE INCREMENT.
C SUBROUTINE RKGS AUTOMATICALLY ADJUSTS THE INCREMENT DURING
C THE WHOLE COMPUTATION BY HALVING OR DOUBLING. IF MORE THAN
C 10 BISECTIONS OF THE INCREMENT ARE NECESSARY TO GET
C SATISFACTORY ACCURACY, THE SUBROUTINE RETURNS WITH
C ERROR MESSAGE IHLF=11 INTO MAIN PROGRAM.
C TO GET FULL FLEXIBILITY IN OUTPUT, AN OUTPUT SUBROUTINE
C MUST BE FURNISHED BY THE USER.
C FOR REFERENCE, SEE
C RALSTON/WILF, MATHEMATICAL METHODS FOR DIGITAL COMPUTERS,
C WILEY, NEW YORK/LONDON, 1960, PP.110-120.

C
C
C SUBROUTINE RKGS(PRMT,Y,DERY,NDIM,IHLF,FCT,OUTP,AUX)

C
C IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
C DIMENSION Y(1),DERY(1),AUX(8,NDIM),A(4),B(4),C(4),PRMT(1)
C DO 1 I=1,NDIM
1 AUX(8,I)=.06666667*DERY(I)
C X=PRMT(1)
C XEND=PRMT(2)
C H=PRMT(3)
C PRMT(5)=0.
C CALL FCT(X,Y,DERY)

C

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
C      ERROR TEST
      IF(H*(XEND-X))38,37,2
C
C      PREPARATIONS FOR RUNGE-KUTTA METHOD
2  A(1)=.5
   A(2)=.2928932
   A(3)=1.707107
   A(4)=.1666667
   B(1)=2.
   B(2)=1.
   B(3)=1.
   B(4)=2.
   C(1)=.5
   C(2)=.2928932
   C(3)=1.707107
   C(4)=.5
C
C      PREPARATIONS OF FIRST RUNGE-KUTTA STEP
DO 3 I=1,NDIM
  AUX(1,I)=Y(I)
  AUX(2,I)=DERY(I)
  AUX(3,I)=0.
3  AUX(6,I)=0.
  IREC=0
  H=H+H
  IHLF=-1
  ISTEP=0
  IEND=0
C
C
C      START OF A RUNGE-KUTTA STEP
4  IF((X+H-XEND)*H)7,6,5
5  H=XEND-X
6  IEND=1
C
C      RECORDING OF INITIAL VALUES OF THIS STEP
7  CALL OUTP(X,Y,DERY,IREC,NDIM,PRMT)
   IF(PRMT(5))40,8,40
8  ITEST=0
9  ISTEP=ISTEP+1
C
C
C      START OF INNERMOST RUNGE-KUTTA LOOP
      J=1
10  AJ=A(J)
     BJ=B(J)
     CJ=C(J)
     DO 11 I=1,NDIM
       R1=H*DERY(I)
       R2=AJ*(R1-BJ*AUX(6,I))
       Y(I)=Y(I)+R2
       R2=R2+R2+R2
11  AUX(6,I)=AUX(6,I)+R2-CJ*R1
     IF(J-4)12,15,15
12  J=J+1
     IF(J-3)13,14,13
13  X=X+.5*H
14  CALL FCT(X,Y,DERY)
     GOTO 10
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSEN BROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
C      END OF INNERMOST RUNGE-KUTTA LOOP
C
C
C      TEST OF ACCURACY
15  IF(ITEST)16,16,20
C
C      IN CASE ITEST=0 THERE IS NO POSSIBILITY FOR TESTING OF ACCURACY
16  DO 17 I=1,NDIM
17  AUX(4,I)=Y(I)
    ITEST=1
    ISTEP=ISTEP+ISTEP-2
18  IHLF=IHLF+1
    X=X-H
    H=.5*H
    DO 19 I=1,NDIM
      Y(I)=AUX(1,I)
      DERY(I)=AUX(2,I)
19  AUX(6,I)=AUX(3,I)
    GOTO 9
C
C      IN CASE ITEST=1 TESTING OF ACCURACY IS POSSIBLE
20  IMOD=ISTEP/2
    IF(ISTEP-IMOD-IMOD)21,23,21
21  CALL FCT(X,Y,DERY)
    DO 22 I=1,NDIM
      AUX(5,I)=Y(I)
22  AUX(7,I)=DERY(I)
    GOTO 9
C
C      COMPUTATION OF TEST VALUE DELT
23  DELT=0.
    DO 24 I=1,NDIM
24  DELT=DELT+AUX(8,I)*ABS(AUX(4,I)-Y(I))
    IF(DELT-PRMT(4))28,28,25
C
C      ERROR IS TOO GREAT
25  IF(IHLF-10)26,36,36
26  DO 27 I=1,NDIM
27  AUX(4,I)=AUX(5,I)
    ISTEP=ISTEP+ISTEP-4
    X=X-H
    IEND=0
    GOTO 18
C
C      RESULT VALUES ARE GOOD
28  CALL FCT(X,Y,DERY)
    DO 29 I=1,NDIM
      AUX(1,I)=Y(I)
      AUX(2,I)=DERY(I)
      AUX(3,I)=AUX(6,I)
      Y(I)=AUX(5,I)
29  DERY(I)=AUX(7,I)
    CALL OUTP(X-H,Y,DERY,IHLF,NDIM,PRMT)
    IF(PRMT(5))40,30,40
30  DO 31 I=1,NDIM
    Y(I)=AUX(1,I)
31  DERY(I)=AUX(2,I)
    IREC=IHLF
    IF(IEND)32,32,39
```

PROGRAMM ZUR OPTIMIERUNG NACH ROSENBROCK MIT EINEM UNTERPROGRAMM
ZUR LOESUNG VON DIFFERENTIAL GLEICHUNGEN NACH RUNGE UND KUTTA

```
C
C      INCREMENT GETS DOUBLED
32 IHLF=IHLF-1
   ISTEP=ISTEP/2
   H=H+H
   IF(IHLF)4,33,33
33 IMOD=ISTEP/2
   IF(ISTEP-IMOD-IMOD)4,34,4
34 IF(DELT-.02*PRMT(4))35,35,4
35 IHLF=IHLF-1
   ISTEP=ISTEP/2
   H=H+H
   GOTO 4

C
C
C      RETURNS TO CALLING PROGRAM
36 IHLF=11
   CALL FCT(X,Y,DERY)
   GOTO 39
37 IHLF=12
   GOTO 39
38 IHLF=13
39 CALL OUTP(X,Y,DERY,IHLF,NDIM,PRMT)
40 RETURN
   END
```